

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045609**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.11**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/63** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201991797**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.02.08**

---

**(54) ВЫСОКОАКТИВНЫЙ И КОРОТКИЙ ПРОМОТОР, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ  
ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ**

---

**(31)** 17155338.1; 17163245.8

**(32)** 2017.02.09; 2017.03.28

**(33)** EP

**(43)** 2020.01.14

**(86)** PCT/EP2018/053201

**(87)** WO 2018/146205 2018.08.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вундерлих Керстин, Эйл Тако Жилль,  
Веллинга Йорт, Сандерс Барбара  
Петронелла, Ван Дер Влюгт Ремко  
(NL)**

**(74)** Представитель:  
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Кузнецова Т.В.,  
Соколов Р.А. (RU)**

**(56)** DATABASE EMBL [Online] 7 June 2009 (2009-06-07), "Aotine herpesvirus 1 strain S34E, complete genome.", XP002769200, retrieved from EBI accession no. EMBL:FJ483970 Database accession no. FJ483970 sequence  
US-A1-2012190106

FOECKING M K ET AL.: "Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 45, no. 1, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 101-105, XP025688566, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(86)90137-X [retrieved on 1986-01-01]. Whole doc, especially Fig.1,2

US-A1-2009181424

ADDISON CL ET AL.: "Comparison of the human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 78, no. 7, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 1653-1661, XP002102028, ISSN: 0022-1317 Abstract, Fig.2, 3

CHAN YU-JIUN ET AL.: "Synergistic interactions between overlapping binding sites for the serum response factor and ELK-1 proteins mediate both basal enhancement and phorbol ester responsiveness of primate cytomegalovirus major immediate-early promoters in monocyte and T-lymphocyte cell types", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 70, no. 12, 1 December 1996 (1996-12-01), pages 8590-8605, XP002331463, ISSN: 0022-538X. Whole doc, in particular Fig 1

---

**(57)** В изобретении представлен промотор AoHV-1 для применения с плазмидными векторами, вирусными векторами, вирусами и клеточными линиями, содержащими промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. В изобретении также представлены способы получения и применения рекомбинантных плазмидных векторов, вирусных векторов, вирусов и клеточных линий, содержащих промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном.

---

**B1**

**045609**

**045609**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к областям биологических исследований, медицины и другим областям применения, связанным с экспрессией гетерологичных генов. Более конкретно настоящее изобретение относится к высокоактивному и короткому промотору, предназначенному для экспрессии гетерологичного гена в экспрессионных кассетах плазмид, вирусных векторах и клеточных линиях, который может быть использован отдельно или в комбинации с традиционным используемыми промоторами, с такими как промотор hCMV.

### Предпосылки к созданию изобретения

Рекомбинантные векторы экспрессии широко используются в ряде применений в областях молекулярной биологии с целью экспрессии гетерологичных белков, в том числе, например, в системах экспрессии генов млекопитающих для биологических исследований, с целью получения клеточных линий для продуцирования вирусных векторов, и в качестве вирусных векторов для генной терапии и вакцинации. В случае применения в областях генной терапии и вакцинации векторы, в том числе вирусные векторы, применяют в качестве носителей для представляющих интерес гена или генов, предназначенных для введения в клетки. Например, вирусные векторы можно применять для экспрессии гена или его части, кодирующей необходимый антиген, требующийся для вызова иммунного ответа.

Элементы, действующие в цис-положении, которые представляют собой часть векторов экспрессии, могут оказывать значительное влияние на эффективность применения плазмид и вирусных векторов. Промоторы представляют собой основные элементы, действующие в цис-положении, которые помещают в экспрессионные кассеты векторов экспрессии и которые определяют общий уровень экспрессии. Промотор инициирует транскрипцию, и поэтому представляет собой важную точку контроля экспрессии представляющего интерес клонированного гена. Промоторные последовательности, широко используемые в векторах экспрессии, получают из вирусов или регуляторных последовательностей генов эукариот.

К числу традиционно используемых энхансерных и промоторных последовательностей в векторах экспрессии и вирусных векторах относятся, например, промоторы hCMV, CAG, SV40, mCMV, EF-1 $\alpha$  и hPGK. Из-за своей высокой активности и среднего размера, составляющего примерно 0,8 т.о., промотор hCMV является одним из наиболее широко используемых среди этих промоторов. Промотор hPGK характеризуется небольшим размером (примерно 0,4 т.о.), однако он является менее активным, чем промотор hCMV. С другой стороны, промотор CAG, состоящий из раннего энхансерного элемента цитомегаловируса, промотора, первого экзона и интрона гена бета-актина кур и акцептора сплайсинга гена бета-глобина кролика, может управлять экспрессией генов с высокой эффективностью, что сопоставимо с промотором hCMV, однако его большой размер делает его менее подходящим в вирусных векторах, где пространственные ограничения могут представлять собой значительную проблему, например, в аденовирусных векторах (AdV), векторах на основе аденоассоциированных вирусов (AAV) или лентивирусных векторах (LV).

В определенных случаях требуется экспрессия по меньшей мере двух антигенов с одного вектора. В тех ситуациях, когда две экспрессионные кассеты помещают в вектор с целью экспрессии двух разных генов, ограничения по размеру для экспрессионных кассет и промоторных последовательностей в частности являются особенно важными. Помимо ограничений по размеру, при размещении двух экспрессионных кассет в векторе экспрессии нежелательно использование идентичных или даже существенно подобных промоторных последовательностей, поскольку это может приводить к генетической нестабильности вектора в ходе получения. Таким образом, желательно использовать относительно небольшие и относительно активные разные промоторные последовательности, которые характеризуются незначительной идентичностью последовательности по отношению друг к другу или не являются идентичными, если две экспрессионные кассеты размещают в векторе с целью экспрессии двух разных генов.

При создании клеточных линий для получения вирусных векторов также требуется высокоактивный промотор с последовательностью, отличающейся от других промоторов, традиционно используемых в экспрессионных кассетах вирусных векторов, как например, традиционно используемый промотор hCMV. Значимые отрезки с идентичностью последовательности между геномом клеточной линии и вектором, продуцирующимся в ней, могут приводить к гомологичной рекомбинации и таким образом к генетической нестабильности или гетерогенности образующихся порций векторов (например, Lochmuller et al, 1994), поэтому предпочтительно их избегать (например, Fallaux et al, 1998; Murakami et al, 2002). Также для таких вариантов применения будет требоваться применение высокоактивного промотора с низкой идентичностью или с отсутствием идентичности с традиционно используемым промотором hCMV.

Таким образом, сохраняется потребность в выявлении высокоактивных промоторов, которые предпочтительно будут короткими и которые будут характеризоваться незначительной идентичностью с промотором hCMV, или такая идентичность будет отсутствовать, для применения, например, в плазмидах, вирусных векторах и клеточных линиях.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении представлены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содер-

жащие участок главного промотора гена немедленно-раннего ответа из Aotine herpesvirus 1 (промотор AoHV-1), а также векторы, в том числе, например, плазмидные векторы, вирусные векторы, рекомбинантные вирусы и рекомбинантные клеточные линии, содержащие промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. В настоящем изобретении также представлены молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащие промотор AoHV-1, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые могут быть использованы для модуляции транскрипции с промотора AoHV-1.

Общие и предпочтительные варианты осуществления определены, соответственно, с помощью независимых и зависимых пунктов формулы изобретения, прилагаемой к данному документу, которые для краткости включены в данное описание посредством ссылки. Другие предпочтительные варианты осуществления, признаки и преимущества различных аспектов настоящего изобретения станут очевидными из представленного ниже подробного описания в сочетании с прилагаемыми графическими материалами.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен промотор AoHV-1, где промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном для экспрессии трансгена с помощью плазмидных векторов, вирусных векторов или рекомбинантных вирусов, или в геноме клеток-хозяев, содержащих промотор AoHV-1.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен плазмидный вектор, содержащий промотор AoHV-1, при этом плазмидный вектор содержит менее 1 т.о. ДНК AoHV-1.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена экспрессионная кассета, содержащая промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, при этом трансген является гетерологичным по отношению к промотору AoHV-1, например, где трансген функционально не связан с промотором AoHV-1 в природе и/или трансген не происходит из AoHV-1. Экспрессионная кассета может быть, например, интегрирована в плазмиду, вектор, вирусный вектор, вирусный геном, клеточную линию и т.д. В настоящем изобретении также представлен способ получения такой экспрессионной кассеты, предусматривающий конструирование экспрессионной кассеты с использованием рекомбинантных средств или путем синтеза нуклеиновых кислот. В настоящем изобретении также представлен способ экспрессирования трансгена, предусматривающий обеспечение экспрессии трансгена с экспрессионной кассеты по настоящему изобретению, например, в рекомбинантной клеточной линии.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены рекомбинантные клеточные линии, содержащие промотор AoHV-1, где промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, может присутствовать в клеточной линии в составе, например, плазмидных векторов, вирусных векторов или рекомбинантных вирусов с целью экспрессии трансгена с них. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, интегрирован в геном рекомбинантной клеточной линии для экспрессии трансгена в ней. В определенных вариантах осуществления трансген интегрирован в геном клеточной линии и кодирует тетрациклин-индуцируемый белок-репрессор (TetR). В соответствующих определенных вариантах осуществления указанная клеточная линия представляет собой клеточную линию PER.C6.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении также представлен способ экспрессирования трансгена в клетке, при этом способ предусматривает обеспечение клетки с рекомбинантным вектором, содержащим промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении также представлен способ получения представляющего интерес белка, где промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном, кодирующим представляющий интерес белок, при этом способ предусматривает обеспечение клетки, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес белок, и экспрессию представляющего интерес белка из клетки. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает извлечение представляющего интерес белка из клеток, или из культуральной среды, или как из клеток, так и из культуральной среды. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает очистку представляющего интерес белка. Предпочтительно представляющий интерес белок представляет собой белок, который не кодируется Aotine herpesvirus-1 в природе, т.е. он представляет собой гетерологичный белок.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен промотор AoHV-1, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые могут быть использованы для модуляции транскрипции с промотора AoHV-1. В соответствующих определенных вариантах осуществления он может, например, быть репрессирован за счет связывания репрессора с последовательностью, связывающейся с репрессором, которая функционально связана с промотором AoHV-1. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1 может быть индуцирован за счет удаления репрессора или за счет обеспечения индуцирующей сигнальной последовательностью или индуцирующего средства.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен промотор AoHV-1, функционально связанный с одной или несколькими тетрациклин-индуцируемыми операторными последовательностями (сайтами tetO), за счет чего экспрессия может быть обратимо контролируемой.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также представлен способ получения рекомбинантного вируса, содержащего промотор AoHV-1, при этом способ предусматривает получение конструкции, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, и встраивание указанной конструкции в геном рекомбинантного вируса.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном, кодирующим представляющий интерес белок, при этом представляющий интерес белок является терапевтическим белком или антигеном.

В определенных вариантах осуществления вирусы и вирусные векторы, содержащие промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, представляют собой рекомбинантные аденовирусы (гAd) и векторы на основе гAd.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гAd и векторам на основе гAd, содержащим промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, и к способам получения и/или применения гAd и векторов на основе гAd, где гAd и векторы на основе гAd содержат промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус по настоящему изобретению имеет делецию в участке E1, а в определенных вариантах осуществления содержит промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном в данном участке E1. В качестве альтернативы также можно использовать другие участки рекомбинантных аденовирусов. Например, экспрессионная кассета, содержащая промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, также может быть размещена в участке E3, или в правом конце генома, между участком E4 и правым ITR рекомбинантного аденовируса.

В определенных вариантах осуществления вектор на основе гAd в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере по одному существенно важному функциональному гену из участка E1, например, из участка E1a и/или участка E1b, аденовирусного генома, который требуется для репликации вируса. В определенных вариантах осуществления аденовирусный вектор в соответствии с настоящим изобретением является дефектным по меньшей мере в части участка E3, не являющегося ключевым. В определенных вариантах осуществления вектор является дефектным по меньшей мере по одному ключевому функциональному гену из участка E1, и по меньшей мере в части участка E3, не являющегося ключевым. Аденовирусный вектор может быть "множественно дефектным", это означает, что данный аденовирусный вектор является дефектным по одному или нескольким ключевым функциональным генам в каждом из двух или более участков аденовирусного генома. Например, вышеупомянутые аденовирусные векторы с дефектом по E1 или с дефектом по E1, E3 могут дополнительно быть дефектными по меньшей мере по одному ключевому гену из участка E4 и/или по меньшей мере одному ключевому гену из участка E2 (например, из участка E2A и/или участка E2B).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения также представлена молекула рекомбинантной ДНК, содержащая геном рекомбинантного аденовируса, содержащего промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1. Экспрессию люциферазы из различных конструкций промоторов оценивали с помощью временных трансфекций в клетках HEK293. Экспрессию люциферазы измеряли в относительных световых единицах (RLU) и вводили поправку на эффективность трансфекции за счет измерения уровней SEAP. Результаты показаны для указанных промоторов по сравнению с положительным контролем люциферазы под контролем промотора hCMV и отрицательным контролем нетрансфицированных клеток.

Фиг. 2. Выравнивания последовательностей hCMV и короткого chCMV или короткого AoHV-1 осуществляли с помощью инструментального средства CLC. Выделение серым обозначает отличия в нуклеотидах между выравненными последовательностями. Выравнивания выполняли с использованием полной промоторной последовательности. Однако на фигуре показан только участок, в котором выравнивают последовательности, поскольку эти участки являются релевантными в отношении потенциальных событий гомологической рекомбинации. Пунктирные линии обозначают участки без выравнивания (гэпы). (А) Участок выравнивания hCMV по отношению к короткому chCMV. (В) Участок выравнивания hCMV по отношению к короткому AoHV-1.

Фиг. 3. Тестирование "7xTetO-AoHV-1" в отношении применимости в качестве tTA-чувствительного промотора для регулируемой экспрессии. Клетки Vero временно трансфицировали плазмидой, в которой экспрессия люциферазы Gaussia находится под контролем 7xTetO-AoHV-1 (7xTetO, размещенный выше корового промотора AoHV-1), что дает минимальную промоторную активность. С целью индуцирования активности промотора осуществляли котрансфекцию плазмидой, экспрессирующей тетрациклин-индуцируемый белок-трансактиватор (tTA). Доксидиклин добавляли в культуральную среду для клеток, котрансфицированных плазмидой tTA, с целью отключения активности промотора. Промотор из вируса саркомы Рауса (RSV) использовали в качестве положительного контроля.

Фиг. 4. Исследование TetR-репрессируемого короткого варианта AoHV-1 для регулируемой экспрессии представляющего интерес гена (GOI) в клетках. (А) Сравнение активности промоторов hCMV, hPGK и короткого AoHV-1 в отношении индуцирования экспрессии eGFP при временных трансфекциях

плазмидами. Показаны изображения экспрессии eGFP, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа Evos. (B) Конструирование и тестирование регулируемого варианта короткого AoHV-1. Временная экспрессия eGFP, находящегося под контролем AoHV.2xtetO или стандартного промотора hCMV (pCDNA), в клетках PER.C6-hCMV.TetR. (C) Регулируемая экспрессия GOI, находящегося под контролем, под контролем AoHV.2xtetO в стабильной клеточной линии. Показана экспрессия GOI в анализе вестерн-блоттинг. Обозначение полос: полоса 1: клон 11, полоса 2: клон 11+доксидин, полоса 3: клон 73, полоса 4: клон 73+доксидин, полоса 5: положительный контроль экспрессии, клетки, временно трансфицированные плазмидой, экспрессирующей GOI под контролем промотора AoHV-1, полоса 6: отрицательный контроль (нетрансфицированные клетки PER.C6).

Фиг. 5. (A) Схематическое представление геномов векторов Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL. Открытые стрелки обозначают вставки двух трансгенных кассет: экспрессионной кассеты Gluc, управляемой промотором CMV или CMVtetO, вставленной в местоположении делеции участка E1, и экспрессионной кассеты RFL, управляемой промотором AoHV-1, вставленной между участком E4 и RITR. Черные стрелки обозначают промоторы, управляющие трансгенными кассетами. Серые стрелки обозначают кодирующие последовательности. GLuc, люцифераза Gaussia. RFL, люцифераза красных светлячков. LITR и RITR, левые и правые инвертированные концевые повторы. CMV, главный промотор гена немедленно-раннего ответа цитомегаловируса человека (MIEP hCMV). CMVtetO, MIEP hCMV, снабженные двумя тетрациклин-индуцируемыми операторными последовательностями (TetO) (для TetR-репрессируемой экспрессии). AoHV-1 P, короткий промотор AoHV-1. SV40pA, сигнальная последовательность полиаденилирования, полученная из вируса SV40. BGHpA, сигнальная последовательность полиаденилирования, происходящая из гена бычьего гормона роста. E4, участок E4 Ad26. (B) Анализ целостности трансгенной (TG) кассеты для очищенных порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL по идентичности в ПЦР. ПЦР осуществляли с целью амплификации кассеты TG, вставленной в E1 ("E1 PCR"), и кассеты TG, расположенной между E4 и RITR ("E4 PCR1" и "E4 PCR2"). Ожидаемые размеры продуктов ПЦР в случае различных ПЦР указаны на вкладке к фигуре. L, 1 т.о. с маркером молекулярной массы ДНК (Invitrogen), P1=pAdApt26 (Abbink et al., 2007) с "пустой" экспрессионной кассетой (т.е. состоящей из промотора hCMV и сигнальной последовательности полиаденилирования SV40, но без кодирующей последовательности TG). P2, pWE.Ad26.dE3.5orf6 (Abbink et al., 2007) без вставки трансгенной кассеты между участком E4 и RITR. W, без контроля в виде матрицы ДНК. V1, вирусная ДНК Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL. V2, вирусная ДНК Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL. (C и D) Анализ экспрессии трансгена с помощью очищенных порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL. Клетки A549, высеянные в 96-луночные планшеты, инфицировали трижды при указанном соотношении вирусных частиц и клеток (VP/клетка), и активности GLuc и RFL определяли в образцах, собранных через 2 дня после инфицирования. RLU, относительные световые единицы. Ad26.CMV (пустой), соответствующий контрольный вирусный вектор Ad26, который не несет кодирующие последовательности GLuc или RFL. \*, одно выпадающее значение 187 RLU, которое наблюдали в случае инфицирования Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL при 10 VP/клетка, удаляли (другие два значения в случае этого тройного инфицирования составляли 14 и 2 6 RLU).

Фиг. 6. (A) Карта плазмиды pC\_AoHV\_TetR. Серые стрелки обозначают кодирующие последовательности для тетрациклин-индуцируемого белка-репрессора (TetR), неомицин-фосфотрансферазы II и бета-лактамазы; черные стрелки обозначают другие генетические элементы. Открытая стрелка обозначает синтетическую последовательность, которая была вставлена в pCDNA2004Neo(-) для конструирования pC\_AoHV\_TetR. AoHV-1 P, короткий промотор AoHV-1. TetR, кодон-оптимизированная кодирующая последовательность тетрациклин-индуцируемого репрессора. BGH pA, сигнальная последовательность полиаденилирования, полученная из гена бычьего гормона роста. SV40 P, промотор, полученный из вируса SV40. pUC ori, точка начала репликации pUC. bla P, промотор для управления экспрессией бета-лактамазы. (B) Стабильность экспрессии TetR клонами клеток PER.C6/TetR при длительном пассажировании, исследуемая с помощью проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием в поколениях 20, 40 и 60. Показаны TetR-позитивные фракции, выявленные для каждого клона (выращенные с селекцией и без селекции) в каждой временной точке. PER.C6, контрольная клеточная линия PER.C6 без конструкции TetR, выращенная без селекции антибиотиком. (C) Функциональность TetR после длительного пассажирования (60 удвоений популяции). Клоны клеток PER.C6/TetR инфицировали Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL, после чего определяли активность GLuc и RFL. Для повтора инфицирования активность GLuc, управляемую промоторами CMV или CMVtetO, нормализовали по активности RFL, управляемой промотором AoHV-1, наблюдаемой для того же самого образца. Полученные нормализованные значения Gluc выражали на этой фигуре по отношению к значениям для клеточной линии TetR-отрицательного контроля (PER.C6). +, клетки выращивали с использованием селекции антибиотиком. -, клетки выращивали без использования селекции антибиотиком. Контроль (+), ранее определенная клеточная линия TetR-положительного контроля, полученная из PER.C6 за счет стабильной трансфекции pCDNA6/TR (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу: V102520) плазмидой, содержащей последовательность TetR, находящейся под контролем промотора

CMV человека.

Фиг. 7. (А) Конструирование усеченных и удлиненных вариантов промотора AoHV-1. Представлено изображение отрезка размером 2774 п.о. из генома Aotine herpesvirus-1, соответствующего, слева направо, нуклеотидам с номерами от 157077 до 154304 № доступа NC 016447 в GenBank. Меченые столбцы обозначают различные варианты промотора AoHV-1, которые были сконструированы и тестированы в данном документе.

Последовательности v00 и v06 обозначают короткий промотор AoHV-1 с собственным нативным сайтом AvтII или без него соответственно. D и A, предполагаемые сайты донора и акцептора сплайсинга соответственно. TATA, предполагаемый TATA-бокс. Inr, предполагаемая инициаторная последовательность (содержащая предполагаемый сайт инициации транскрипции). (В) Результаты тестирования эффективности различных вариантов промотора AoHV-1 во временно трансфицированных клетках PER.C6. Средние значения результатов двух экспериментов показаны по отношению к короткому промотору v00 AoHV-1.

### Подробное описание изобретения

В данном документе описаны результаты экспериментов, связанных с идентификацией, конструированием и тестированием нового промотора, полученного из участка энхансера/промотора немедленного ответа Aotine herpesvirus-1 (промотор AoHV-1). Результаты показывают, что промотор AoHV-1 обеспечивает эффективную экспрессию трансгена, с которым он функционально связан, на основе временной трансфекции плазмидными векторами в различных клеточных линиях и при вирусных инфекциях вирусами, содержащими промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. Промотор AoHV-1 также представляет собой сравнительно короткий промотор, поэтому он является подходящим для применения во многих областях применения, где ограничения по размеру представляют собой проблему. Таким образом, промотор AoHV-1 по настоящему изобретению является подходящим для применения в тех областях применения, в которых эффективная экспрессия играет первостепенное значение и/или в которых небольшой размер промотора AoHV-1 является целесообразным, например, чтобы оставить больше пространства для трансгенов в ограниченном размере вируса или вирусного генома по сравнению с другими более длинными промоторами. Кроме того, благодаря низкой степени гомологии последовательностей с другими традиционно используемыми промоторами, такими как hCMV, промотор AoHV-1 также является применимым в тех областях применения, где существует проблема идентичности последовательностей между двумя промоторами, предназначенными для совместного одновременного использования, например, при экспрессии двух различных трансгенов с одного и того же вирусного вектора или при получении вирусов с использованием линий клеток-продуцентов, которые также содержат промоторные последовательности hCMV.

Промотор AoHV-1 также является подходящим для применения с регуляторными последовательностями, которые могут быть использованы для модуляции транскрипции с промотора AoHV-1.

Таким образом, настоящее изобретение относится к молекулам рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащим промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению векторов и вирусов, содержащих промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, для экспрессии трансгена в клетке. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению могут представлять собой плазмиду, космиду, фагмиду, бактериофаг, искусственную хромосому бактерий, искусственную хромосому дрожжевых грибов, искусственную хромосому человека, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вектор, альфавирусный вектор, вектор на основе вируса герпеса, вектор на основе вируса Эпштейна-Барра, вектор на основе вируса осповакцины или их химеры. Специалистам в данной области техники будет понятно, что промотор AoHV-1 по настоящему изобретению также будет применим в других векторах, используемых в областях экспрессии генов и переноса генов, особенно таких, в которых важной является эффективная экспрессия и существенным фактором является общий размер экспрессионной кассеты.

Настоящее изобретение также относится к применению векторов с целью обеспечения продуцирования клетками-хозяевами гетерологичных белков или других представляющих интерес продуктов экспрессии. Например, плазмидные векторы, содержащие промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, могут быть использованы для экспрессирования гетерологичного белка в клетке. Такие плазмидные векторы могут представлять собой последовательности, содержащие ДНК, например, (1) промотор AoHV-1; (2) консенсусную последовательность Козак для трансгена с целью инициации трансляции; (3) кодирующий участок для трансгена, например, последовательность нуклеотидов, которая кодирует необходимый полипептид; (4) последовательность терминации для трансгена, которая обеспечивает терминацию трансляции, когда весь код для трансгена был считан; (5) сигнальные последовательности полиаденилирования и/или вставочные последовательности и другие элементы, известные специалистам в данной области техники, для экспрессии трансгенов из определенных векторов; и (6) обязательно, если вектор не вставлен непосредственно в геном, точку начала репликации, которая обеспечивает репродуцирование всего вектора после того, как он проник внутрь клетки. Вектор может быть введен в клетку-хозяина, например, с помощью трансфекции, электропорации или инфекции, и клетки-хозяева

можно культивировать с экспрессией трансгена.

Плазмидные векторы по настоящему изобретению в определенных вариантах осуществления дополнительно содержат один или несколько сайтов множественного клонирования (MCS), также называемых полилинкерами, которые представляют собой короткие сегменты ДНК, содержащие несколько сайтов рестрикции. Эти сайты рестрикции в MCS, как правило, являются уникальными и встречаются лишь один раз в указанной плазмиде. MCS обычно используют в ходе процедур, включающих молекулярное клонирование или субклонирование, которые особенно применимы в биотехнологии, биоинженерии и молекулярной генетике, поскольку они способствуют вставке фрагмента ДНК или нескольких фрагментов ДНК в участок с MCS, например, с целью вставки экспрессионной кассеты, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, кодирующим представляющий интерес белок, для экспрессии в клетке.

В настоящем изобретении также представлены клетки, трансформированные векторами, описанными в данном документе, и рекомбинантные клеточные линии, содержащие промотор AoHV-1, где промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном. В данном контексте трансформация относится к любому процессу, с помощью которого вещество в виде гетерологичной нуклеиновой кислоты вводится в клетку и экспрессируется в ней. Таким образом, трансформация, используемая в данном документе, включает процедуры "временной" и "стабильной" трансфекции, в том числе без ограничения процедуры, опосредованные электропорацией, комплексами катионный липид/ДНК, комплексами белок/ДНК, пиноцитозом, опосредованные фосфатом кальция, вирусными векторами и т. д., при этом нуклеиновая кислота, вводимая в клетку-хозяина, существует внехромосомно или при этом трансфицированные нуклеиновые кислоты интегрированы в геном клетки-хозяина. Процедуры трансфекции также могут включать вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую селективный маркер (например, маркер устойчивости к антибиотику), который обеспечивает возможность позитивной селекции клеток таким образом, что сохраняется трансфицированная нуклеиновая кислота, содержащая промотор AoHV-1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, может присутствовать в клеточной линии в составе, например, плазмидных векторов, вирусных векторов и рекомбинантных вирусов для экспрессии трансгена с них. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, может быть интегрирован в геном рекомбинантной клеточной линии для экспрессии трансгена в ней.

В настоящем изобретении также представлен способ экспрессирования трансгена в клетке, при этом трансген представляет собой, например, трансген, кодирующий представляющий интерес белок, или при этом трансген содержит некодирующую последовательность (например, регуляторную РНК, такую как микроРНК, короткую интерферирующую РНК (siRNA) или антисмысловую РНК и т.д.), при этом способ предусматривает получение клетки с вектором, содержащим промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. В частности, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ получения представляющего интерес продукта экспрессии в клетке, при этом промотор AoHV-1 функционально связан с трансгеном, кодирующим представляющий интерес продукт экспрессии, при этом способ предусматривает получение клетки, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес продукт экспрессии, и экспрессию представляющего интерес продукта экспрессии в клетке. В определенных вариантах осуществления продукт экспрессии представляет собой белок. В определенных вариантах осуществления продукт экспрессии представляет собой тетрациклин-индуцируемый белок-репрессор (TetR). Способ может дополнительно предусматривать извлечение продукта экспрессии, например, представляющего интерес белка, например, из клеток, или из культуральной среды, или как из клеток, так и из культуральной среды. Способ может также предусматривать очистку белка для различных целей, в том числе, например, диагностических, терапевтических или профилактических целей, научных исследований и т.д. Кроме того, представляющий интерес очищенный белок может необязательно быть составлен в фармацевтическую композицию. Терапевтические белки могут включать, например, антикоагулянты, факторы свертывания крови, факторы роста, гормоны, антитела, белки слияния на основе Fc, костные морфогенетические белки, сконструированные белковые каркасы, ферменты и цитокины, например, хемокины, интерфероны, интерлейкины, лимфокины и факторы некроза опухоли и т.д.

В настоящем изобретении также представлен способ получения вируса, предусматривающий размножение вируса в клетке, которая экспрессирует ген, который принимает участие в размножении указанного вируса, при этом указанный ген находится под контролем промотора AoHV-1 и при этом указанный ген кодирует нуклеиновую кислоту (например, регуляторную РНК) или белок, например, белок, который компенсирует дефект цикла репликации вируса или другой функции вируса (например, инфекции). Вирус может представлять собой вирус дикого типа, однако предпочтительно представляет собой рекомбинантный вирус, например, с дефектом, который делает его репликацию или инфицирование дефектными. Кроме того, указанный ген может экспрессироваться из внехромосомного элемента или предпочтительно из генома клетки (клетки, которая затем может происходить из стабильной клеточной линии) и клетка может культивироваться в культуральной среде таким образом, что вирус может быть извлечен и необязательно очищен, а затем использован для инфицирования других клеток или для состав-

ления в фармацевтической композиции и т.д.

"Клетка" или "клетка-хозяин" в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любую клетку, в которой промотор AoHV-1 может быть активным. В определенных вариантах осуществления клетку выделяют из ее здоровой ткани и, например, ее могут культивировать в культуральной среде (*in vitro*). В определенных вариантах осуществления клетка или клетка-хозяин в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой иммортализованную клетку, например, из клеточной линии. В определенных вариантах осуществления клетка или клетка-хозяин в соответствии с настоящим изобретением представляет собой клетку млекопитающего или клетку птицы, предпочтительно клетку млекопитающего. Некоторые неограничивающие примеры клеток или клеток-хозяев в соответствии с настоящим изобретением представляют собой клетки грызунов, клетки человека, клетки обезьян, клетки собак, клетки кур и т.д. Некоторые неограничивающие примеры клеток или клеток-хозяев в соответствии с настоящим изобретением представляют собой клетку Vero, клетку MDCK, клетку HEK293, клетку PER.C6, клетку CHO, клетку-фибробласт эмбриона цыпленка, клетку гибридомы, клетку почки новорожденного хомяка (BHK), клетку HeLa, клетку A549 и т.п. Специалисту в данной области техники будет понятно, что промотор AoHV-1 может быть использован во многих различных клетках для управления экспрессией представляющего интерес продукта экспрессии, и что тип клетки не является ключевым для настоящего изобретения.

В определенных аспектах в настоящем изобретении представлена клетка-продуцент, в которой промотор AoHV-1 функционально связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок TetR, при этом предпочтительно промотор AoHV-1 и последовательность, кодирующая TetR, интегрированы в геном клетки-продуцента, при этом предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего, предпочтительно клетку человека, а в особо предпочтительных вариантах осуществления клетка-продуцент получена из клетки PER.C6 (см., например, патентный документ US 5994128) за счет интеграции в ее геном промотора AoHV-1 и последовательности, кодирующей TetR. Таким образом, в настоящем изобретении представлена клетка PER.C6, содержащая трансген, интегрированный в геном указанной клетки, при этом трансген содержит нуклеиновую кислоту, содержащую промотор AoHV-1, функционально связанный с последовательностью, кодирующей TetR. В неограничивающих вариантах осуществления трансген имеет последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 20. Таким образом, такие клетки экспрессируют TetR, и к примеру, могут быть использованы для получения рекомбинантного аденовируса, который кодирует представляющий интерес продукт экспрессии под контролем промотора, который может регулироваться TetR, например, CMV или другого промотора, функционально связанного с одним или несколькими сайтами tetO, что может быть особо предпочтительным, если представляющий интерес продукт экспрессии, который кодируется аденовирусом, будет токсичным для клетки-продуцента, или будет снижать стабильность или выход рекомбинантного аденовируса, если он будет продуцироваться в ходе размножения аденовируса. В таких системах TetR может репрессировать tetO-регулируемый промотор, например, tetO-регулируемый промотор hCMV, в ходе продуцирования в клетке-продуценте таким образом, что представляющий интерес продукт экспрессии не образуется или образуется только в очень низких количествах в ходе размножения и продуцирования рекомбинантного вируса, что приводит к повышенному выходу и/или стабильности рекомбинантного аденовируса во время получения. В одном аспекте в настоящем изобретении также представлена комбинация, содержащая: (i) клетку-продуцент, которая содержит промотор AoHV-1, функционально связанный с последовательностью, кодирующей TetR, и (ii) рекомбинантный аденовирус, который содержит последовательность, кодирующую представляющий интерес продукт экспрессии, функционально связанный с промотором, который функционально связан с одним или несколькими сайтами tetO.

В настоящем изобретении также представлены способы лечения генетических заболеваний, болезней обмена веществ или приобретенных заболеваний с использованием векторов или вирусов, содержащих промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. Способ предусматривает приведение клетки в контакт с достаточным количеством вектора или вируса по настоящему изобретению, содержащих промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, где клетку трансформируют с тем, чтобы трансген экспрессировался в клетке. Клетка может быть трансформирована *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

Важным аспектом векторов, будь то ДНК-векторы, такие как плазмидные векторы, или вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, является способность этих векторов размещать необходимые трансгенные последовательности. Такая способность может лимитироваться ограничениями по размеру векторов, которые, например, могут стать нестабильными, или даже их продуцирование может стать невозможным, если превышены определенные лимиты размеров. Таким образом, пространство, занимаемое промотором, является важным аспектом при конструировании новых векторов, помимо функциональных возможностей, которыми должны обладать такие промоторы. Промотор AoHV-1 по настоящему изобретению обладает преимуществом в том, что он является относительно коротким, что означает, что при определенном ограничении размера вектора остается больше места для трансгена, что позволяет, например, включить больше эпитопов, если трансген представляет собой иммуноген, или позволяет осуществлять экспрессию крупных белков по сравнению с другими промоторами большего размера. До-

полнительным преимуществом промотора AoHV-1 по настоящему изобретению является возможность его объединения с промотором hCMV в системе, например, оба промотора в одной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как вектор, или один промотор в клеточной линии и другой промотор в молекуле нуклеиновой кислоты, такой как вектор, присутствующий в клеточной линии, с весьма ограниченным риском возникновения гомологичной рекомбинации между промоторными последовательностями или его отсутствием благодаря низкой степени гомологии последовательности промотора AoHV-1 и промотора hCMV.

Используемые в данном документе термины "низкая степень гомологии последовательности" и "низкая степень идентичности последовательности", поскольку они связаны с последовательностью промотора hCMV, относятся к промоторным последовательностям, которые менее чем на приблизительно 50% идентичны промотору hCMV, и предпочтительно менее чем на приблизительно 40% идентичны промотору hCMV. Кроме того, промоторные последовательности с "низкой степенью гомологии последовательности" и "низкой степенью идентичности последовательности" предпочтительно также не имеют отрезков непрерывного идентичного выравнивания длиннее приблизительно 15 нуклеиновых кислот или более предпочтительно не имеют отрезков идентичного выравнивания длиннее приблизительно 14 нуклеиновых кислот. В определенном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой короткий промотор AoHV-1 (SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:30), а идентичность по отношению к промотору hCMV составляет 36%, и при этом отсутствуют отрезки непрерывного идентичного выравнивания длиннее 14 нуклеиновых кислот. В других предпочтительных вариантах осуществления промотор содержит фрагмент SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:30, обладающий промоторной активностью, например, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26. Используемое в данном документе выравнивание относится к способам, хорошо известным специалистам в данной области техники, например, с использованием таких алгоритмов, как BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), предназначенных для выравнивания и сравнения различных нуклеотидных последовательностей или последовательностей белка (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990).

В настоящем изобретении также представлены клетки или трансгенные организмы, трансформированные векторами или вирусами, содержащими промотор hCMV и промотор AoHV-1, при этом промотор hCMV и промотор AoHV-1 функционально связаны с трансгенами таким образом, что оба трансгена экспрессируются в клетках или трансгенном организме. Промотор hCMV и промотор AoHV-1 могут присутствовать в разных молекулах (например, один промотор в плазмиде или в вирусе, а другой промотор в геноме клетки, или оба промотора в другой плазмиде, или оба промотора в геноме клетки) или оба промотора могут присутствовать в одной молекуле (например, в одной хромосоме генома, или в одной плазмиде, или в одном геноме вируса).

В настоящем изобретении также представлен способ получения рекомбинантного вируса, при этом трансген эффективно экспрессируется, если вирус введен в целевую клетку, при этом способ предусматривает: получение конструкции, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, и встраивание указанной конструкции в рекомбинантный вирус с последующим введением вектора в клетку, например, путем инфицирования вирусом. Получение собственно конструкции охватывает применение хорошо известных стандартных способов молекулярного клонирования, (см., например, (Holterman et al., 2004; Lemckert et al., 2006; Vogels et al., 2003); Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al, eds, 1987; серия *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); PCR2: *A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995), которые известны специалисту в данной области техники и обычно проводятся в области технологии рекомбинантных векторов и рекомбинантных вирусов, и они приведены в данном документе в качестве примера. Промотор AoHV-1 имеет описанные выше признаки, и с точки зрения настоящего изобретения они могут быть получены с помощью стандартных способов, таких как ПЦР или синтез нуклеиновых кислот *de novo*. С целью удобства специалист в данной области техники может осуществлять манипуляции с геномом вируса посредством клонирования в небольшие фрагменты, например, первая часть для левой части генома аденовируса до участка E1 для простоты манипуляции и введения трансгенов в плазмидную форму, и вторая большая часть для остального генома, что может в результате рекомбинации с первой частью привести к образованию полного генома аденовируса (см., например, WO 99/55132).

"Гетерологичная нуклеиновая кислота" или "гетерологичный ген" (также называемый в данном документе как "трансген" или "представляющий интерес ген"), например, в векторах, или вирусах, или клетках по настоящему изобретению, представляет собой нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях не присутствует в векторе, или вирусе, или клетке, или которая в природе функционально не связана с промотором AoHV-1. Ее вводят в вектор, или вирус, или клетку, например, посредством стандартных методик молекулярной биологии. В определенных вариантах осуществления она может кодировать представляющий интерес белок или его часть. В таких случаях представляющий интерес белок может называться "гетерологичным белком", поскольку в естественных условиях он не кодируется последовательностью, функционально связанной с промотором AoHV-1 в природе. Например, трансген может быть клонирован в плазмидный вектор или в удаленный участок E1 или E3 аденовирусного вектора. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессионную кассету с промотором АоНВ-1, функционально связанным с трансгеном, помещают в участок Е1 аденовирусного генома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессионную кассету с промотором АоНВ-1, функционально связанным с трансгеном, помещают в участок Е3 аденовирусного генома. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессионную кассету с промотором АоНВ-1, функционально связанным с трансгеном, размещают между участком Е4 и правым ITR аденовирусного генома. В других вариантах осуществления экспрессионная кассета с промотором АоНВ-1, функционально связанным с трансгеном, присутствует в плазмидном векторе. В других вариантах осуществления экспрессионную кассету с промотором АоНВ-1, функционально связанным с трансгеном, интегрируют в геном клетки. Такие клетки или клеточные линии могут быть использованы для рекомбинантной экспрессии трансгена, например, путем культивирования клеток в условиях, при которых промотор является активным (если используется нерегулируемый вариант промотора, т.е. если к промотору не добавлены не являющиеся регуляторными элементы, эта экспрессия будет спонтанно происходить при культивировании) и управляет экспрессией трансгена.

Используемые в данном документе термины "промотор", или "промоторный участок", или "промоторный элемент" используются взаимозаменяемо и относятся к сегменту последовательности нуклеиновой кислоты, как правило, без ограничения к ДНК, которая контролирует транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Промоторный участок включает специфические последовательности, которые являются достаточными для распознавания РНК-полимеразой, связывания и инициации транскрипции. Кроме того, промоторный участок может необязательно включать последовательности, которые модулируют активность такого распознавания, связывания и инициации транскрипции РНК-полимеразой. Данные последовательности могут быть действующими в цис-положении или могут быть чувствительными к факторам, действующим в трансположении. Кроме того, промоторы могут быть конститутивными или регулируемыми в зависимости от природы регуляции.

Специалисту в данной области техники будет известно, что промоторы состоят из отрезков последовательностей нуклеиновой кислоты и зачастую содержат элементы или функциональные единицы в этих отрезках последовательностей нуклеиновой кислоты, такие как сайт инициации транскрипции, сайт связывания для РНК-полимеразы, сайты связывания общего фактора транскрипции, такие как ТАТА-бокс, сайты связывания специфического фактора транскрипции и т. п. Также могут присутствовать дополнительные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, и в ряде случаев интроны на конце промоторной последовательности. Такие функциональные блоки могут непосредственно прилегать друг к другу, но также могут быть разделены участками нуклеиновой кислоты, которая не играет прямой роли в функции промотора. Специалист в данной области техники может обращаться к примерам в данном документе для проверки того, являются ли нуклеотиды в составе отрезка нуклеиновой кислоты соответствующими функции промотора, и для проверки влияния удаления или добавления нуклеотидов в определенную промоторную последовательность посредством стандартных способов молекулярной биологии, например, чтобы свести к минимуму ее длину, сохраняя при этом активность промотора, или для оптимизации активности. Также в промотор могут быть введены мутации, чтобы уменьшить (отрезки) идентичность(идентичности) по отношению к другим промоторам (например, hCMV), если предполагается, что эти промоторы присутствуют или используются одновременно в одной и той же клетке.

Используемый в данном документе термин "энхансер" относится к регуляторным последовательностям ДНК, например, 50-1500 п. о., которые могут быть связаны белками (активирующими белками) для стимуляции или усиления транскрипции гена или нескольких генов. Данные активаторные белки (также известные как факторы транскрипции) взаимодействуют с медиаторным комплексом и способствуют привлечению полимеразы II и общих факторов транскрипции, которые затем иницируют транскрибирование генов. Энхансеры обычно являются действующими в цис-положении, но могут быть расположены либо выше, либо ниже сайта инициации транскрипции гена или генов, которые они регулируют. Кроме того, энхансер может быть либо в прямом, либо в обратном направлении и не должен располагаться рядом с сайтом инициации транскрипции, чтобы оказывать влияние на транскрипцию, поскольку некоторые были обнаружены на несколько сотен тысяч пар оснований выше или ниже сайта инициации транскрипции. Энхансеры также можно обнаружить в интронах.

Последовательности в данном документе представлены в направлении 5'-3', как принято в данной области. Также следует отметить, что термины "выше" и "ниже" относятся к направлению транскрипции, и их применение является общеизвестным в данной области техники. Например, в соответствии с соглашением термины выше и ниже относятся к направлению 5'-3', в котором происходит транскрипция РНК. Под "выше" подразумевается направление к 5'-концу молекулы РНК, и под "ниже" подразумевается направление к 3'-концу. При рассмотрении двухнитевой ДНК под "выше" подразумевается направление к 5'-концу кодирующей нити для рассматриваемого гена, и под "ниже" подразумевается направление к 3'-концу. В силу антипараллельной природы ДНК это означает, что 3'-конец матричной нити располагается выше гена, а 5'-конец располагается ниже.

Промотор АоНВ-1 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит последо-

вательность ТАТА-бокса, такую как последовательность, расположенную в SEQ ID NO:25 в положениях 251-258. "ТАТА-бокс", как определено в данном документе, представляет собой последовательность ДНК, которая может быть выявлена с помощью ТАТА-связывающего белка (ТБП) и которая имеет консенсусную последовательность ТАТАВАВР (где W представляет собой А или Т, и R представляет собой А или G). Она обычно расположена на приблизительно 25-35 пар оснований выше от сайта инициации транскрипции. В определенных вариантах осуществления промотор АоНВ-1 по настоящему изобретению содержит последовательность ТАТА-бокса ТАТАТААГ (последовательность под SEQ ID NO:25, положения 251-258). Специалисту в данной области техники будет понятно, что указанная последовательность ТАТА-бокса (т.е. ТАТАТААГ) промотора АоНВ-1 может быть замещена аналогичной канонической последовательностью ТАТА-бокса, т.е. последовательностью, которая соответствует консенсусной последовательности ТАТАВАВР (где W представляет собой А или Т, и R представляет собой А или G), без ожидаемого значительного снижения промоторной активности.

Промотор АоНВ-1 в соответствии с настоящим изобретением может также содержать (предполагаемый) инициаторный элемент (Inr), например, расположенный в SEQ ID NO:25 в положениях 280-286 (последовательность: ССАТТСГ). В тех вариантах осуществления, где присутствует Inr, предполагается, что замена указанной последовательности Inr (т.е. ССАТТСГ) промотора АоНВ-1 на другую последовательность, в значительной степени соответствующую последовательности Inr YYANWYY (где Y представляет собой С или Т; N представляет собой А, С, G или Т; и W представляет собой А или Т) существенно не повлияет на активность указанного промотора.

В определенных вариантах осуществления, где присутствует предполагаемая Inr, промотор АоНВ-1 содержит ТАТА-бокс, соответствующий положениям 251-258, а также последовательностям под SEQ ID NO:25, до приблизительно нуклеотида 286. Не ограничиваясь теорией, в случае определенных вариантов осуществления для промотора АоНВ-1 по настоящему изобретению может быть предпочтительным содержать как ТАТА-бокс, так и Inr, при этом последовательность Inr расположена на приблизительно 25-40, например, на приблизительно 29-36 нуклеотидов ниже первого нуклеотида ТАТА-бокса.

Также в вариантах осуществления, где присутствует Inr, предпочтительно включение по меньшей мере на приблизительно 25-35 пар оснований ниже ТАТА-бокса и выше кодирующей последовательности, функционально связанной с представляющим интерес геном. Настоящее изобретение включает по меньшей мере один пример промотора АоНВ-1, который больше не содержит консенсусную последовательность Inr в естественном местоположении на приблизительно 29-35 нуклеотидов ниже первого нуклеотида ТАТА-бокса, при этом такой промотор по-прежнему является активным, демонстрируя, что последовательность Inr в этом положении не является необходимой для функционального промотора.

Промотор АоНВ-1 в соответствии с настоящим изобретением определен в данном документе как последовательность, характеризующаяся промоторной активностью и которая на по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентична или на 100% идентична фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO:25. Предпочтительно указанный фрагмент содержит фрагмент из по меньшей мере 50 нуклеотидов, который на по меньшей мере 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 237-286, и предпочтительно указанные по меньшей мере 50 нуклеотидов содержат фрагмент ТАТАВАВР (консенсусная последовательность ТАТА-бокса) в положении, соответствующем приблизительно нуклеотидам 251-258 в последовательности под SEQ ID NO: 25.

Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления промотор АоНВ-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 237-286.

3'-усечения промоторов АоНВ-1 по настоящему изобретению, вероятно, могут быть выполнены ниже приблизительно нуклеотида 286 в SEQ ID NO: 25 (т.е. ниже предполагаемой Inr, которая содержит предполагаемый сайт инициации транскрипции, который, как предполагается, расположен в нуклеotide 282 в данной последовательности) без значительного влияния на промоторную активность, в то время как более крупные 3'-усечения, которые удаляют предполагаемую Inr/сайт инициации транскрипции, или особенно те, которые удаляют как указанную Inr/сайт инициации транскрипции, так и указанный ТАТА-бокс, как предполагается, приводят к снижению промоторной активности. И действительно, как было показано, 3'-усеченные варианты короткого промотора АоНВ-1 (SEQ ID NO: 30), которые не содержали последовательностей АоНВ-1 ниже нуклеотида 399 (т.е. в том числе только 1 нуклеотид АоНВ-1 ниже предполагаемой Inr по отношению к SEQ ID NO: 30, соответствующий нуклеотиду 287 в SEQ ID NO: 25), по-прежнему демонстрировали активность в качестве промоторов.

В данном документе было продемонстрировано, что сравнительно короткий промоторный фрагмент (SEQ ID NO: 26), содержащий только 120 нуклеотидов выше своего ТАТА-бокса, по-прежнему характеризуется значительной промоторной активностью, которая может быть в некоторой степени дополнительно повышена за счет добавления нескольких дополнительных расположенных выше последовательностей (как например, в SEQ ID NO:25). В отличие от этого, удлинение короткого промотора АоНВ-1 (SEQ ID NO: 30) на его 3'-конце (т.е. ниже предполагаемой Inr/сайта инициации транскрипции) в ре-

зультате включения определенных дополнительных ниже расположенных последовательностей (как например, в SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:28 и SEQ ID NO:29), по-видимому, не добавляло значительной активности.

В предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 201-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 187-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 137-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который является на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичным или на 100% идентичным последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 131-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 87-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 37-286.

В более предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит фрагмент, который на по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 1-286.

В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 98% идентична по меньшей мере 200 нуклеотидам из последовательности под SEQ ID NO:26 (снова предпочтительно, содержащую по меньшей мере Inr и последовательности, расположенные выше нее, в том числе ТАТА-бокс, и последовательности, расположенные еще выше, например, по меньшей мере приблизительно нуклеотиды 87-286 из последовательности под SEQ ID NO: 25), более предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO:26, еще более предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 99% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO:25. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1 содержит фрагмент из от 240 до 1500 нуклеотидов, предпочтительно от 240 до 1000 нуклеотидов, более предпочтительно из от 240 до 500 нуклеотидов, который на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен фрагменту из SEQ ID NO: 32, при этом указанный фрагмент SEQ ID NO: 32 включает фрагмент, который на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичен или на 100% идентичен нуклеотидам SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 201-286 (которые соответствуют нуклеотидам 1359-1444 из SEQ ID NO: 32) .

В настоящем изобретении представлен высокоактивный промотор AoHV-1 сравнительно небольшого размера, который может быть особенно предпочтительным в контексте ограничений по размеру векторов, несущих трансгены (т. е. можно разместить большие трансгены, и/или векторы могут оставаться более стабильными). Таким образом, промотор AoHV-1 по настоящему изобретению составляет предпочтительно менее 2000 нуклеотидов (2 т.о.) в длину, предпочтительно менее 1 т.о., более предпочтительно менее 0,8 т.о. В определенных предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 составляет менее 700, менее 650, менее 600, менее 550, менее 500 нуклеотидов в длину. В определенных предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 составляет по меньшей мере 200, по меньшей мере 240, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400 нуклеотидов в длину. В определенных предпочтительных вариантах осуществления промотор AoHV-1 составляет от 200 до 500, например, от 240 до 485 нуклеотидов в длину. Как показано в данном документе, несмотря на присутствие сравнительно короткой последовательности, этот новый промотор AoHV-1 неожиданно был способен управлять эффективной экспрессией трансгена, с которым он был функционально связан.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что мутации могут быть осуществлены в предусмотренных последовательностях и полученные в результате промоторы могут быть протестированы в отношении активности промотора с помощью общепринятых способов. Также варианты последовательностей могут существовать в природе, например, в различных изолятах вируса, и поэтому такие варианты могут иметь некоторые отличия в нуклеотидной последовательности, однако сохраняют одни и те же функциональные характеристики. В типичном случае последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична указанному промоторным последовательностям, по-прежнему будет иметь функциональную активность, и поэтому будет считаться промотором AoHV-1. Таким образом, промотор AoHV-1 по настоящему изобретению предпочтительно содержит последовательность, которая на по меньшей мере

90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична или на 100% идентична предпочтительным последовательностям промотора AoHV-1, представленным в данном документе, таким последовательностям, как любая из SEQ ID NO:1, 30, 25 или 26. Специалисту в данной области техники также будет известно, что длина последовательностей различных участков предусмотренных промоторных последовательностей может в некоторой степени варьироваться и могут быть получены аналогичные результаты. Исследование того, по-прежнему ли фрагмент или мутантная последовательность промоторных последовательностей, представленных в качестве примера в данном документе, обладают промоторной активностью, может быть выполнено без излишних затрат специалистом в данной области техники с использованием информации, раскрытой в данном документе.

Предпочтительный вариант осуществления промотора AoHV-1 по настоящему изобретению представляет собой промотор AoHV-1, содержащий SEQ ID NO:26. Промотор AoHV-1 по настоящему изобретению предпочтительно на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен SEQ ID NO:26 или ее фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150 или 200 нуклеотидов. В определенном предпочтительном варианте осуществления промотор AoHV-1 на 100% идентичен SEQ ID NO:26 или ее фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150 или 200 нуклеотидов.

Дополнительный предпочтительный промотор AoHV-1 по настоящему изобретению представляет собой промотор AoHV-1, содержащий SEQ ID NO:25. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению предпочтительно на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен или на 100% идентичен SEQ ID NO:25 или ее фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 нуклеотидов. В определенном предпочтительном варианте осуществления промотор AoHV-1 на 100% идентичен SEQ ID NO:25 или ее фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 нуклеотидов.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению представляет собой короткий промотор AoHV-1, содержащий SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:30. В определенных вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению предпочтительно на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен SEQ ID NO:1 или ее фрагменту из по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или 400 нуклеотидов. В определенном предпочтительном варианте осуществления промотор AoHV-1 на 100% идентичен SEQ ID NO:1 или на 100% идентичен SEQ ID NO:30 или фрагменту одной из данных последовательностей из по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или 400 нуклеотидов.

В других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99% идентична или на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:22.

В других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99% идентична или на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:23.

В других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99% идентична или на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:27.

В других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99% идентична или на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:28.

В других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99% идентична или на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:29.

В определенных других вариантах осуществления промотор AoHV-1 по настоящему изобретению представляет собой коровый промотор (SEQ ID NO:31), функционально связанный с одной или несколькими операторными последовательностями и/или энхансерными последовательностями с целью модуляции транскрипции, например, с последовательностями tetO, операторными последовательностями из куатного оперона, энхансерами из существующих в природе пар энхансер-промотор, например, SV40 или hCMV (Foecking & Hofstetter, 1986), синтетическими энхансерами (Schlabach, Hu, Li, & Elledge, 2010) или другими регуляторными последовательностями, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Предполагается, что используемый в данном документе термин "коровый промотор" обозначает минимальную функциональную единицу промотора с очень низкой собственной промоторной активностью, который, однако, может управлять эффективной экспрессией трансгена, когда коровый промотор объединяют с одной или несколькими регуляторными последовательностями с целью модуляции транскрипции с корового промотора, например, с последовательностями tetO, которые могут быть связаны с тетрациклин-индуцируемым белком-трансактиватором (tTA). См., например, (Smale, 2001) в отношении описания последовательностей коровых промоторов.

Трансген, функционально связанный с промотором AoHV-1, может эффективно экспрессироваться. Используемые в данном документе термины "эффективно экспрессируемый" или "эффективная экспрессия" означают, что экспрессия с промотора AoHV-1, измеренная, например, с помощью одной из различ-

ных методик выявления белка, таких как вестерн-блоттинг, FACS-анализ или другие виды анализа с использованием люминесценции или флуоресценции, на по меньшей мере приблизительно 30, 40, 50, 60%, 70, 80, 90, 95% или предпочтительно на приблизительно 100% или выше, чем экспрессия с промотора hCMV (имеющего SEQ ID NO:4). Следует отметить, что промотор hCMV намного сильнее по сравнению с другими традиционно используемыми промоторами, такими как промоторы hPGK, UBI C или RSV LTR (Powell, Rivera-Soto, & Gray, 2 015). Промоторы hCMV получают из участка гена главного немедленнo-раннего ответа (mIE) цитомегаловируса человека и часто применяют для высокоактивной экспрессии гена в составе векторов для вакцины и генной терапии. Например, последовательность промотора hCMV можно получить из локуса mIE штамма AD169 hCMV (X03922), и она включает сайты связывания NF1, энхансерный участок, TATA-бокc и часть первого экзона. Известны другие последовательности промотора hCMV, которые могут быть короче (например, содержащие только энхансерный и промоторный участки и не содержащие сайтов связывания NF1) или длиннее (например, включающие дополнительные сайты связывания клеточных факторов и первую интронную последовательность). Было установлено, что данные промоторы hCMV, которые различаются по длине, являются эффективными повсеместно активными промоторами. Примеры усеченных промоторов hCMV раскрыты в патентном документе US 74 07 8 01, включенном в данный документ посредством ссылки. Используемый в данном документе термин "промотор hCMV" содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80%, предпочтительно на по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 99 или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:4 в нуклеотидах 578-736, предпочтительно в нуклеотидах 564-736. Было показано, что фрагмент из нуклеотидов 578-736 в последовательности под SEQ ID NO: 4 продемонстрировал промоторную активность в экспериментах в нашей лаборатории (не показано), а другими было продемонстрировано, что последовательность с рядом ошибок спаривания по отношению к нуклеотидам 564-736 в последовательности под SEQ ID NO: 4 обеспечивает высокие уровни экспрессии (например, патентный документ US 7407801 B2, SEQ ID NO: 1 в том же документе). В определенных вариантах осуществления промотор hCMV содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности под SEQ ID NO: 4. С целью сравнения уровней экспрессии, описанных в данном документе, использовали промоторную последовательность hCMV под SEQ ID NO:4. Например, уровень экспрессии с промотора AοHV-1 по настоящему изобретению в векторе составляет предпочтительно по меньшей мере приблизительно 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или предпочтительно 100% или больше от уровня экспрессии с вектора, где трансген находится под контролем промотора hCMV с последовательностью под SEQ ID NO:4. Кроме того, известно, что в случае гAd, экспрессирующего антиген под контролем промотора hCMV, экспрессия является достаточной для инициации значимых иммунных ответов с участием Т-клеток и В-клеток. Аналогично ожидается, что экспрессия трансгена, экспрессируемого с помощью промотора AοHV-1 по настоящему изобретению из гAd, будет иницировать значимый иммунный ответ с участием Т-клеток и В-клеток на трансген. Например, если трансген кодировал антиген, который вызывает иммунный ответ при введении субъекту, то ожидается, что эффективная экспрессия трансгена будет вызывать измеримый иммунный ответ на антиген.

Термин "приблизительно" для числовых значений, используемых в данном изобретении, означает значение  $\pm 10\%$ .

Термины "кодирующая последовательность", "последовательность, которая кодирует", или "кодирующая" в данном документе используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (ДНК) и транслируется (мРНК) в полипептид *in vitro* или *in vivo* при функциональном связывании с соответствующими регуляторными последовательностями.

Сигнальная последовательность полиаденилирования, например, сигнальная последовательность polyA гена бычьего гормона роста (патентный документ US 5122458) или сигнальная последовательность polyA SV40, могут располагаться позади трансгенов.

Дополнительные регуляторные последовательности также могут быть добавлены в конструкции, содержащей промотор AοHV-1 по настоящему изобретению. В данном документе термин "регуляторная последовательность" используют взаимозаменяемо с термином "регуляторный элемент", и он относится к сегменту нуклеиновой кислоты, как правило, без ограничения к ДНК, которая модулирует транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана, и таким образом действует как транскрипционный модулятор. Данная модуляция экспрессии может быть особенно целесообразной в тех случаях, когда экспрессия белка является токсичной для клетки-хозяина, например, когда экспрессия является летальной для клетки-хозяина или отрицательно влияет на клеточный рост и/или уменьшает или устраняет продуцирование белка. Кроме того, модуляция экспрессии также может быть целесообразной в тех случаях, когда экспрессия приводит к нестабильности вектора или когда время экспрессии имеет значение для эксперимента, выполняемого *in vitro* или *in vivo*. Регуляторная последовательность зачастую содержит последовательности нуклеиновых кислот, которые распознаются связывающими нуклеиновые кислоты доменами транскрипционных белков и/или факторов транскрипции, которые активируют или репрессируют транскрипцию. Например, регуляторная последовательность может включать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 и т.д.) тетрациклин-

индуцируемых операторных последовательностей (сайты tetO), чтобы таким образом экспрессия ингибировалась в присутствии тетрациклин-индуцируемого репрессорного белка (tetR), см., например, патентный документ WO 1999/000510 A1. Пример отдельной последовательности tetO представляет собой СССТАТСАГТГАТАГАГ (SEQ ID NO:14). В отсутствие тетрациклина белок tetR может связываться с сайтами tetO и подавлять транскрипцию гена, функционально связанного с сайтами tetO. Однако в присутствии тетрациклина конформационное изменение белка tetR предотвращает его связывание с операторными последовательностями, что обеспечивает транскрипцию функционально связанных генов. В определенных вариантах осуществления вектор или гAd по настоящему изобретению может необязательно включать один или несколько сайтов tetO, функционально связанных с промотором AoHV-1, за счет чего экспрессия одного или нескольких трансгенов ингибируется в векторах, которые продуцируются в линии клеток-продуцентов, в которой экспрессируется белок tetR. Следовательно, экспрессия не будет ингибироваться, если вектор введен субъекту или в клетки, которые не экспрессируют белок tetR (см. например, патентный документ WO 07/073513). В других определенных вариантах осуществления векторы по настоящему изобретению могут необязательно включать систему переключения генов с использованием кумата, в которой регуляция экспрессии опосредуется связыванием репрессора (CymR) с сайтом оператора (CuO), функционально связанным, например, за счет размещения его рядом с сайтом инициации транскрипции промотора (см., например, (Mullick et al., 2006)). В других вариантах осуществления хорошо известную систему lac-репрессора объединяют с промотором по настоящему изобретению, при этом один или несколько сайтов lac-оператора функционально связывают с промотором таким образом, что связывание lac-репрессорного белка может быть использовано для регуляции экспрессии.

Используемый в данном документе термин "репрессор" относится к объектам (например, к белкам или другим молекулам), обладающим способностью ингибировать, препятствовать, замедлять и/или подавлять продуцирование гетерологичного белкового продукта рекомбинантного вектора экспрессии. Например, путем воздействия на сайт связывания в подходящем месте вдоль вектора экспрессии, как например, в кассете экспрессии. Примеры репрессоров включают tetR, CymR, lac-репрессор, trp-репрессор, gal-репрессор, лямбда-репрессор и другие соответствующие репрессоры, известные из уровня техники.

Термины "функционально связан" или "связанный по функции" в данном документе используются взаимозаменяемо и относятся к функциональной связи последовательностей нуклеиновой кислоты с регуляторными последовательностями нуклеотидов, такими как промоторы, энхансеры, репрессорные последовательности, транскрипционные и трансляционные стоп-сайты и другие сигнальные последовательности, и указывают на то, что два или более сегментов ДНК соединены вместе таким образом, что они функционируют согласно их предполагаемым целям. Например, связь по функции последовательностей нуклеиновой кислоты, как правило, ДНК, с регуляторной последовательностью или промоторным участком относится к физической и функциональной связи между ДНК и регуляторной последовательностью или промотором, за счет чего транскрипция такой ДНК инициируется от регуляторной последовательности или промотора с помощью РНК-полимеразы, которая специфически распознает, связывает и транскрибирует ДНК. С целью оптимизации экспрессии и/или транскрипции *in vitro* существует возможность модифицирования регуляторной последовательности для экспрессии нуклеиновой кислоты или ДНК в типе клеток, в которых она экспрессируется. Целесообразность или необходимость такой модификации может быть установлена эмпирическим путем.

В настоящем изобретении также представлен способ экспрессии трансгена в клетке, при этом способ предусматривает обеспечение клетки с рекомбинантным вирусом, например, рекомбинантным аденовирусом, содержащим промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. Доставку в клетку рекомбинантного аденовируса можно осуществлять посредством введения аденовируса субъекту или посредством введения (например, инфицирования аденовирусом клетки) аденовируса в клетку *in vitro* или *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен рекомбинантный аденовирусный вектор для применения в экспрессии трансгена в клетке, например, путем введения рекомбинантного аденовируса субъекту.

В настоящем изобретении также представлен способ экспрессии трансгена в клетке, при этом способ предусматривает получение клетки с использованием рекомбинантного вируса, например, рекомбинантного аденовируса, содержащего промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, кодирующим продукт экспрессии, такой как представляющий интерес белок, например, при этом представляющий интерес белок представляет собой терапевтический белок или антиген.

В настоящем изобретении также представлен способ индуцирования иммунного ответа против антигена, предусматривающий введение субъекту вектора, например, рекомбинантного аденовируса, содержащего промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном. В настоящем изобретении также представлен вектор или рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением для применения в индуцировании иммунного ответа против антигена.

Промотор AoHV-1 по настоящему изобретению может в определенных вариантах осуществления использоваться, например, для управления экспрессией антигена с целью инициации иммунного ответа на эти антигены в применении в вакцинах. Идентичность трансгена, подходящего, например, для векторов или аденовирусов, содержащих какой-либо трансген, не является темой настоящего изобретения.

Подходящие трансгены хорошо известны специалисту в данной области техники и, к примеру, могут включать открытые рамки считывания трансгенов, к примеру, открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды с терапевтическим эффектом, например, для целей генной терапии, или полипептиды, против которых требуется иммунный ответ, если вектор, например, вектор на основе гAd, используют для целей вакцинации. Особенно предпочтительными гетерологичными нуклеиновыми кислотами являются представляющие интерес гены, кодирующие антигенные детерминанты, в отношении которых необходимо повышение иммунного ответа. Как правило, такие антигенные детерминанты также называют антигенами. Если рекомбинантный вирус вводят субъекту, то будет повышаться иммунный ответ против антигена(антигенов). Любой необходимый антиген может кодироваться вектором. В типичных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением антигены представляют собой пептиды, полипептиды или белки из организмов, которые могут вызывать заболевание или патологическое состояние. Следовательно, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления указанная гетерологичная нуклеиновая кислота, представляющая интерес, кодирует иммуногенную (или антигенную) детерминанту. Более предпочтительно указанная иммуногенная детерминанта представляет собой антиген из бактерии, вируса, дрожжей или паразита. Заболевание, вызванные такими организмами, обычно называют "инфекционным заболеванием" (и таким образом, они не ограничены организмами, которые "инфицируют", но и также включают такие, которые попадают в хозяина и вызывают заболевание). Так называемые "аутоантигены", например, опухолевые антигены, также образуют часть существующего уровня техники и могут кодироваться гетерологичными нуклеиновыми кислотами в рекомбинантных векторах в соответствии с настоящим изобретением. Неограничивающими примерами, из которых выбраны антигенные детерминанты (или антигены), являются организмы, вызывающие малярию, как например, *Plasmodium falciparum*, организмы, вызывающие туберкулез, как например, *Mycobacterium tuberculosis*, дрожжи или вирусы. В других предпочтительных вариантах осуществления антигены из таких вирусов, как флавивирусы (например, из вируса лихорадки Западного Нила, вируса гепатита С, вируса японского энцефалита, вируса денге, вируса Зика), вируса Эбола, вируса иммунодефицита человека (HIV) и вируса Марбург, можно использовать в композициях в соответствии с настоящим изобретением. Иллюстративные неограничивающие примеры антигенов представляют собой белок CS или его иммуногенную часть из *P. falciparum*, белок одного из антигена или слитый белок из нескольких антигенов из *M. tuberculosis*, такой как Ag85A, Ag85B и/или белки TB10.4 или их иммуногенную(иммуногенные) часть(части), вирусный гликопротеин или его иммуногенную часть, такой как GP из филовirusа, такого как вирус Эбола или вирус Марбург, белок HIV, такой как gag, pol, env, nef или их варианты, или белок HA, NA, M или NP или иммуногенную часть любого из них из вируса гриппа, или антиген респираторно-синцитального вируса (RSV), например, белок RSV F или белок RSV G или и первый, и второй, или другие белки RSV, антиген вируса папилломы человека или другого вируса и т.д. Рекомбинантный вектор, например, гAd, может кодировать один антиген, однако также может необязательно кодировать два различных антигена из одного и того же организма, или необязательно из комбинации антигенов из различных организмов, например, первый антиген из первого организма и второй антиген из второго организма. Также существует возможность кодирования антигена и, к примеру, адьюванта в одном и том же векторе, например, в векторе на основе гAd, например, антиген и агонист толл-подобного рецептора (TLR), такой как агонист TLR3, как например, dsRNA или его миметик и им подобные (например, патентный документ WO 2007/100908). В определенных вариантах осуществления рекомбинантный вектор, например, рекомбинантный аденовирус, кодирует два различных антигена, один находится под контролем промотора AοHV-1, и один, находится под контролем другого промотора, например, промотора hCMV. В других вариантах осуществления вектор или рекомбинантный вирус кодирует антиген и иммуномодулятор, один из которых находится под контролем промотора AοHV-1, а другой находится под контролем другого промотора, например, промотора hCMV. В определенных вариантах осуществления дополнительные гетерологичные последовательности или трансгены могут присутствовать в векторе или рекомбинантном вирусе, помимо трансгена, который находится под контролем промотора AοHV-1.

В настоящем изобретении также представлена молекула рекомбинантной ДНК, содержащая промотор AοHV-1 по настоящему изобретению, функционально связанный с трансгеном. В настоящем изобретении также представлен геном рекомбинантного аденовируса, содержащий промотор AοHV-1, функционально связанный с трансгеном. Специалисту в данной области техники будет известно, что это также может быть комбинация из по меньшей мере двух разных молекул рекомбинантной ДНК, которые вместе могут образовать одну молекулу рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению. Такие молекулы являются применимыми в осуществлении манипуляций с геномом и в создании новых рекомбинантных аденовирусов. Геном кодирует белки, которые требуются для репликации аденовируса и упаковки в перmissive клетках.

Используемый в данном документе термин 'рекомбинантный' в отношении рекомбинантного аденовируса подразумевает, что он, в отличие от аденовирусов дикого типа, был модифицирован человеком, например, он содержит гетерологичные ген, гены или их части и промотор AοHV-1, функционально связанный с трансгеном.

Аденовирусные векторы, способы их конструирования и способы их размножения хорошо извест-

ны из уровня техники и описаны, например, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191, 6113913 и 8932607, и Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication" M. S. Horowitz, "Adenoviruses", Chapters 67 and 68, respectively, in Virology, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), и других источниках, упомянутых в данном документе. Как правило, конструирование аденовирусных векторов включает применение стандартных молекулярно-биологических методик, которые хорошо известны из уровня техники, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), и других источниках, упомянутых в данном документе.

Аденовирус в соответствии с настоящим изобретением принадлежит к семейству Adenoviridae и предпочтительно представляет собой аденовирус, принадлежащий к роду

Mastadenovirus. Он может представлять собой аденовирус человека, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, в том числе без ограничения аденовирус крупного рогатого скота (например, аденовирус 3 крупного рогатого скота, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает аденовирус обезьян и аденовирус приматов обезьян, как например, аденовирус шимпанзе или аденовирус горилл). Предпочтительно аденовирус представляет собой аденовирус человека (HAdV или AdHu; в настоящем изобретении при обозначении Ad без указания видов подразумевают аденовирус человека, например, краткое обозначение "Ad5" означает то же самое что и HAdV5, который представляет собой аденовирус человека серотипа 5) или аденовирус обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd, AdCh или SAdV) или аденовирус макака-резуса (RhAd).

Наиболее углубленные исследования были проведены с применением аденовирусов человека, при этом аденовирусы человека являются предпочтительными в соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения. В определенных предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус в соответствии с настоящим изобретением получен из аденовируса человека. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантный аденовирус получен из аденовируса человека серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 или 50. В соответствии с конкретным предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения аденовирус представляет собой аденовирус человека одного из серотипов 26 и 35. Преимуществом данных серотипов является низкое доминирование серотипа и/или низкие титры ранее существующих нейтрализующих антител в популяции человека. Получение векторов на основе гAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в (Abbink et al., 2007). Иллюстративные последовательности генома Ad26 представлены в GenBank под номером доступа EF 153474 и под SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Получение векторов на основе гAd35 описано, например, в патентных документах U.S. 7270811, в WO 00/70071 и в (Vogels et al., 2003). Иллюстративные последовательности генома Ad35 представлены в GenBank под номером доступа AC\_000019 и показаны на фиг. 6 в WO 00/70071.

Известны последовательности большинства вышеупомянутых аденовирусов человека и аденовирусов, не являющихся аденовирусами человека, а для других они могут быть получены с использованием стандартных процедур.

Рекомбинантные аденовирусы в соответствии с настоящим изобретением могут быть репликативно-компетентными или дефектными по репликации.

В определенных вариантах осуществления аденовирус является дефектным по репликации, например, потому что он содержит делецию в участке E1 генома. "Делеция в участке E1" означает делецию в этом участке по сравнению с аденовирусом дикого типа и означает делецию в по меньшей мере одном из кодирующих участков E1A, E1B 55K или E1B 21K, предпочтительно делецию кодирующих участков E1A, E1B 55K и E1B21K. Специалисту в данной области техники известно, что в случае делеций существенно важных участков в геноме аденовируса функциональные элементы, кодируемые этими участками, должны быть обеспечены в транспозиции, предпочтительно клеткой-продуцентом, т.е. если части или целые участки E1, E2 и/или E4 удалены из аденовируса, то они должны присутствовать в клетке-продуценте, к примеру, должны быть встроены в ее геном или находиться в виде так называемого вспомогательного аденовируса-помощника или плазмид-помощников. Аденовирус также может иметь делецию в участке E3, который не является обязательным для репликации, и, следовательно, такую делецию не следует компенсировать.

Клетка-продуцент (также иногда называемая в уровне техники и в данном документе как "пакующая клетка" или "компенсирующая клетка"), которую можно использовать, может представлять собой любую клетку-продуцент, в которой требуемый аденовирус может размножаться. Например, размножение векторов на основе рекомбинантного аденовируса проводят в клетках-продуцентах, которые компенсируют дефекты в аденовирусе. Предпочтительно такие клетки-продуценты содержат в своем геноме по меньшей мере последовательность E1 аденовируса, и, таким образом, они способны к компенсированию рекомбинантных аденовирусов с делецией в участке E1. Можно применять любую E1-компенсирующую клетку-продуцента, например, клетки сетчатки глаза человека, иммортализованные с помощью E1, например, клетки 911 или PER.C6 (см., например, патентный документ U.S. 5994128), E1-

трансформированные амнициты (см., например, EP 1230354), E1-трансформированные клетки A549 (см., например, патентные документы WO 98/39411, U.S. 5891690), клетки GH329:HeLa (Gao, Engdahl, & Wilson, 2000), клетки 293 и т. п. В определенных вариантах осуществления клетками-продуцентами являются, например, клетки HEK293, или клетки PER.C6, или клетки 911, или клетки IT293SF и т. п.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что кроме аденовирусов также и другие вирусы являются подходящими для применения в качестве вирусных векторов с применением промотора AοHV-1 по настоящему изобретению. Например, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирус простого герпеса (HSV), парамиксовирусы, такие как вирус кори, альфавирусы, вирус EBNA, ретровирусы, поксвирус и лентивирус также могут быть сконструированы с включением промотора AοHV-1 по настоящему изобретению. См., например, обзоры разных векторов, которые рассматриваются в (Heilbronn & Weger, 2010; Robbins & Ghivizzani, 1998; Walther & Stein, 2000).

Для введения человеку можно использовать фармацевтические композиции, к примеру, содержащие вектор, рекомбинантный вирус или рекомбинантный белок, экспрессируемый при использовании способов по настоящему изобретению, например, гAd или рекомбинантный белок, экспрессируемый с помощью промотора AοHV-1 по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемые носитель или вспомогательное вещество. В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что носитель или вспомогательное вещество в используемых дозировках и концентрациях не будет вызывать нежелательных или неблагоприятных эффектов у субъектов, которым их вводят. Такие фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества хорошо известны из уровня техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). Очищенный вектор, например, гAd, или белок предпочтительно составляют и вводят в виде стерильного раствора, хотя также возможно применение лиофилизированных препаратов. Стерильные растворы получают с помощью стерилизующей фильтрации или с помощью других способов, известных *per se* в данной области техники. Затем растворы лиофилизируют или заполняют ими контейнеры, предназначенные для лекарственных форм. Показатель pH раствора обычно находится в диапазоне pH от 3,0 до 9,5, например, pH от 5,0 до 7,5. В типичном примере вектор, или гAd, или белок находятся в растворе с подходящим буфером, при этом раствор может также содержать соль. Необязательно может присутствовать стабилизирующее средство, такое как альбумин. В определенных вариантах осуществления добавляют детергент. В определенных вариантах осуществления вектор, гAd или белок может составлять инъекционный препарат. Эти составы, содержащие эффективные количества молекулы фармацевтического ингредиента, например, вектора, гAd или белка, являются либо стерильными жидкими растворами, жидкими суспензиями, либо лиофилизированными вариантами, и необязательно содержат стабилизаторы или вспомогательные вещества.

Фармацевтические препараты могут быть получены для различных путей введения, например, внутримышечной или внутривенной инъекции, ингаляции, внутривенного введения, перорального введения и т. д.

Примеры составов на основе аденовирусов включают аденовирусный мировой стандарт (Hoganson et al., 2002): 20 mM Tris, pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерина; или 20 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, сахароза 10% вес/об., полисорбат-80 0,02% вес/об.; или 10-25 mM цитратный буфер, pH 5,9-6,2, 4-6% (вес/вес) гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (вес/вес.) полисорбат-80 и необязательно 0,3-0,45% (вес./вес.) этанол. Безусловно, можно применять множество других буферов, при этом известны некоторые примеры подходящих составов для хранения и для фармацевтического введения очищенных фармацевтических препаратов.

В определенных вариантах осуществления композиция, содержащая вектор или рекомбинантный вирус по настоящему изобретению, например, гAd, дополнительно содержит один или несколько адъювантов. Адъюванты, известные в данной области техники, предназначены для дополнительного повышения иммунного ответа на используемую антигенную детерминанту, и фармацевтические композиции, содержащие аденовирус и подходящие адъюванты, раскрыты, например, в патентном документе WO 2007/110409, включенном в данный документ посредством ссылки.

Термины "адъювант" и "иммуностимулятор" используются в данном документе взаимозаменяемо, и их определяют как одно или несколько веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы. В данном контексте адъювант используют для усиления иммунного ответа на аденовирусные векторы по настоящему изобретению. Примеры подходящих адъювантов включают соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия; композиции на основе масляной эмульсии (композиции типа "масло-в-воде"), в том числе эмульсии сквалена в воде, такие как MF59 (см., например, WO 90/14837); составы на основе сапонины, такие как, например, QS21 и иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS) (см., например, U.S. 5057540 и WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); производные бактерий или микроорганизмов, примеры которых представляют собой монофосфориллипид А (MPL), 3-О-деацетилированный MPL (3dMPL), олигонуклеотиды, содержащие мотив CpG, ADP-рибозилирующие бактериальные токсины или их мутанты, такие как термолабильный энтеротоксин LT E. coli, холерный

токсин СТ и им подобные. Также возможно применение адъюванта, кодируемого вектором, например, путем использования гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей слияние домена олигомеризации С4-связывающего белка (С4bp) с представляющим интерес антигеном (Ogun, Dumon-Seignovert, Marchand, Holder, & Hill, 2008) или гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей агонист толл-подобного рецептора (TLR), такой как агонист TLR3, как например, dsRNA (см., например, WO 2007/100908), или гетерологичной нуклеиновой кислотой, кодирующей иммуностимулирующий цитокин, например, интерлейкин, например, IL-12 (см., например, патентный документ US 5723127) или им подобные.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением в определенных вариантах осуществления может представлять собой вакцину.

Введение вектора или рекомбинантного вируса по настоящему изобретению, например, композиций на основе аденовируса, может осуществляться с помощью стандартных путей введения. Неограничивающие варианты осуществления включают парентеральное введение, такое как инъекция, например, внутривенная, внутримышечная и т.д., или подкожное или чрескожное введение или введение через слизистые оболочки, например, интраназальное, пероральное и им подобные. Специалисту в данной области техники известны различные варианты введения композиции, например, вакцины, для индуцирования иммунного ответа к антигену(антигенам), присутствующему(присутствующим) в вакцине.

Композиции на основе аденовируса можно вводить субъекту, например, субъекту-человеку. Квалифицированному специалисту-практику известно, что общая доза аденовируса, поступающая субъекту при однократном введении, может варьироваться и обычно составляет от  $1 \times 10^7$  вирусных частиц (vp) до  $1 \times 10^{12}$  vp, предпочтительно от  $1 \times 10^8$  vp до  $1 \times 10^{11}$  vp, например, от  $3 \times 10^8$  до  $5 \times 10^{10}$  vp, например, от  $10^9$  до  $3 \times 10^{10}$  vp.

Субъект, используемый в данном документе, предпочтительно представляет собой млекопитающее, например грызуна, например мышь, или отличного от человека примата, или человека. Предпочтительно субъектом является субъект-человек.

Также возможно проведение одного или нескольких бустерных введений одной или нескольких вакцин. При проведении бустерной вакцинации, как правило, такую бустерную вакцину будут вводить одному и тому же субъекту с промежутком от одной недели до одного года, предпочтительно от двух недель до четырех месяцев, после введения композиции субъекту в первый раз (что в данном случае называется "примирующей вакцинацией"). В альтернативных бустерных режимах также возможно введение различных векторов, например одного или нескольких аденовирусов различных серотипов или других векторов, таких как на основе MVA, или ДНК, или белка, субъекту в качестве примирующей или бустерной вакцинации.

Различные публикации, которые могут включать патенты, опубликованные заявки, технические статьи и научные статьи, цитируются в данном описании в скобках, а полные библиографические данные каждой из них могут быть найдены в конце описания. Каждая из этих процитированных публикаций включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### **Варианты осуществления**

Вариант осуществления 1 представляет собой молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую главный промотор гена немедленно-раннего ответа из Aotine herpesvirus (промотор AoHV-1), функционально связанный с гетерологичным трансгеном.

Вариант осуществления 2 представляет собой плазмидный вектор, содержащий промотор AoHV-1 с сайтом множественного клонирования, располагающимся за ним.

Вариант осуществления 3 представляет собой молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 1 или плазмидный вектор согласно варианту осуществления 2, при этом промотор AoHV-1 функционально связан с регуляторной последовательностью, которая модулирует транскрипцию с промотора AoHV-1.

Вариант осуществления 4 представляет собой молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 1 или плазмидный вектор согласно варианту осуществления 2, где промотор AoHV-1 функционально связан с регуляторной последовательностью, содержащей одну или несколько тетрациклин-индуцируемых операторных последовательностей (сайтов tetO).

Вариант осуществления 5 представляет собой рекомбинантный вектор или рекомбинантный вирус, содержащий молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантами осуществления 1, 3 или 4.

Вариант осуществления 6 представляет собой рекомбинантный вектор в соответствии с вариантом осуществления 5, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

Вариант осуществления 7 представляет собой рекомбинантный вирус в соответствии с вариантом осуществления 5, где вирус представляет собой аденовирус.

Вариант осуществления 8 представляет собой рекомбинантный аденовирус в соответствии с вариантом осуществления 7, где аденовирус имеет делецию в участке своего генома.

Вариант осуществления 9 представляет собой рекомбинантный аденовирус согласно варианту осу-

ществления 8, где делеция находится в участке E1, в участке E3 или как в участке E1, так и в участке E3.

Вариант осуществления 10 представляет собой клетку, содержащую молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 1, 3 или 4, плазмидный вектор в соответствии с вариантом осуществления 2, 3 или 4, или рекомбинантный вектор, или рекомбинантный вирус в соответствии с любым из вариантов осуществления 5-9.

Вариант осуществления 11 представляет собой клетку, содержащую молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1 в своем геноме, где предпочтительно указанный промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес белок.

Вариант осуществления 12 представляет собой клетку, содержащую: (i) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1, функционально связанный с первым трансгеном, и (ii) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном.

Вариант осуществления 13 представляет собой вектор, содержащий: (i) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1, функционально связанный с первым трансгеном, и (ii) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ получения рекомбинантного аденовируса, содержащего промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, где трансген активно экспрессируется при инфицировании аденовирусом целевой клетки, при этом способ предусматривает:

а) получение конструкции, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном; и

б) встраивание указанной конструкции в геном рекомбинантного аденовируса.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ получения молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей промотор AoHV-1, функционально связанный с трансгеном, кодирующим представляющий интерес белок, при этом способ предусматривает клонирование трансгена в функциональной связи с промотором AoHV-1.

Вариант осуществления 16 представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, содержащую геном рекомбинантного аденовируса в соответствии с любым из вариантов осуществления 7-9.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ получения клетки согласно варианту осуществления 11, предусматривающий введение промотора AoHV-1 в клетку и интеграцию промотора AoHV-1 в геном, где предпочтительно указанный промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес белок.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ получения представляющего интерес продукта экспрессии, предусматривающий обеспечение экспрессии трансгена, кодирующего представляющий интерес продукт экспрессии в клетке-хозяине, где трансген функционально связан с промотором AoHV-1.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ согласно варианту осуществления 18, где продукт экспрессии представляет собой белок.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ экспрессии представляющего интерес трансгена, предусматривающий обеспечение экспрессии в клетке-хозяине трансгена из молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вариантов осуществления 1, 3, 4, 5 или 6,

Вариант осуществления 21 представляет собой способ согласно варианту осуществления 20, где представляющий интерес трансген кодирует представляющий интерес белок, который экспрессируется в клетке-хозяине.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ согласно варианту осуществления 19 или 21, дополнительно предусматривающий извлечение представляющего интерес белка из клетки-хозяина или из культуральной среды, где клетку-хозяина культивируют, или как из клетки-хозяина, так и из культуральной среды.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ получения вируса, предусматривающий размножение вируса в клетке, в которой экспрессируется ген, который принимает участие в размножении указанного вируса, где указанный ген находится под контролем промотора AoHV-1.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ согласно варианту осуществления 24, где указанный вирус не продуцирует указанный ген в функциональной форме из своего генома, и где указанный ген необходим для репликации указанного вируса.

Вариант осуществления 26 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантный вектор или рекомбинантный вирус в соответствии с любым из вариантов осуществления 5-9 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 27 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 11, где промотор AoHV-1 в геноме функционально связан с нуклеиновой кислотой, которая кодирует тетрациклин-индуцируемый белок-репрессор (TetR).

Вариант осуществления 28 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 12, где первый трансген кодирует TetR.

Вариант осуществления 29 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 28, которая дополнительно содержит рекомбинантный аденовирус, который содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном.

Вариант осуществления 30 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 29, где промотор hCMV может регулироваться TetR, например, за счет функционального связывания с одним или несколькими сайтами tetO.

Вариант осуществления 31 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 27, 28, 29 или 30, где клетка представляет собой клетку PER.C6.

Вариант осуществления 32 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 20, где трансген кодирует TetR.

Вариант осуществления 33 представляет собой способ в соответствии с вариантом осуществления 32, где клетка представляет собой клетку PER.C6.

Вариант осуществления 34 представляет собой способ размножения рекомбинантного аденовируса, при этом способ предусматривает размножение рекомбинантного аденовируса, который кодирует трансген, находящийся под контролем промотора hCMV, который функционально связан с одним или несколькими сайтами tetO в клетке в соответствии с вариантом осуществления 27, 29 или 31, и предпочтительно выделение рекомбинантного аденовируса.

Вариант осуществления 35 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25 в нуклеотидах 237-286.

Вариант осуществления 36 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 86% идентична, предпочтительно на по меньшей мере 90% идентична, предпочтительно на по меньшей мере 96% идентична, более предпочтительно на 100% идентична последовательности под SEQ ID NO:25 в нуклеотидах 237-286.

Вариант осуществления 37 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25 в нуклеотидах 131-286.

Вариант осуществления 38 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO:31.

Вариант осуществления 39 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит от 240 до 1500 нуклеотидов, предпочтительно от 240 до 1000 нуклеотидов, более предпочтительно от 240 до 500 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO:32.

Вариант осуществления 40 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит SEQ ID NO:26.

Вариант осуществления 41 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична фрагменту из по меньшей мере 300 нуклеотидов в последовательности под SEQ ID NO:25.

Вариант осуществления 42 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит SEQ ID NO:25.

Вариант осуществления 43 представляет собой любой из предыдущих вариантов осуществления, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична фрагменту из по меньшей мере 400 нуклеотидов из последовательности под SEQ ID NO:1.

Вариант осуществления 44 представляет собой вариант осуществления 43, где промотор AoHV-1 содержит SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:30.

Вариант осуществления 45 представляет собой клетку, содержащую трансген, который содержит SEQ ID NO: 20, предпочтительно в геноме клетки.

Вариант осуществления 46 представляет собой клетку в соответствии с вариантом осуществления 45, где клетка представляет собой клетку PER.C6.

### Примеры

Без дополнительного описания полагают, что специалист в данной области техники может с применением предшествующего описания и следующих иллюстративных способов и примеров создать и применять настоящее изобретение и осуществлять на практике заявленные способы. Следовательно, практические примеры конкретно указывают на определенные варианты осуществления, признаки и преимущества настоящего изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие каким-либо образом остальную часть настоящего изобретения. Примеры служат лишь для объяснения настоящего изобретения.

Способы.

Клеточная культура.

Клетки НЕК293 поддерживали на среде игла в модификации Дульбекко (DMEM) с 10% фетальной

бычьей сыворотки (FBS). Клетки Vero культивировали в минимальной питательной среде (MEM, Life Technologies), дополненной 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Клетки PER.C6 (Fallaux et al., 1998) культивировали в DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), дополненной 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Клетки PER.C6-hCMV.TetR (описанные в данном документе) культивировали в аналогичной среде, описанной выше для клеток PER.C6, но дополненной 2 мкг/мл бластицидина (Gibco A11139-03).

Субкультивирование вышеуказанных клеток осуществляли в соответствии со стандартными протоколами с использованием TrypLE Select Enzyme (ThermoFisher, № по кат. 12563011) для отделения клеток.

Плазмиды pAdApt35.

Различные промоторные конструкции клонировали в pAdApt35 (Vogels et al. 2007) с использованием сайтов рестрикции AvrII и HindIII. Ген, кодирующий люциферазу светлячка, вставляли с использованием сайтов рестрикции HindIII и XbaI, что приводило к образованию плазмид pAdapt, в которых ген Luc экспрессировался под контролем различных тестируемых промоторов (pAdapt35.P.Luc). Эти плазмиды использовали в примере 1.

Анализ экспрессии во временно трансфицированных клетках HEK293.

Клетки HEK293 высевали в многолуночных (на 6 лунок) планшетах, покрытых поли-L-лизинном (PLL), и трансфицировали 1 мкг плазмид pAdapt.P.Luc с помощью липофектамина в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителем (Life Technologies).

Затем планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C, 10% CO<sub>2</sub>. Активность люциферазы измеряли через 24 ч после трансфекции в клеточных лизатах в присутствии 0,1% DTT (1 М) в люминометре для микропланшетов Luminoskan™ Ascent. В качестве контроля эффективности трансфекции котрансфицировали плазмиду, секретирующую эмбриональную щелочную фосфатазу (80 нг/лунка). Уровни SEAP измеряли с помощью набора для анализа люминесценции Clontech Great EscAPE™ SEAP Chemoluminescence Kit 2.0 и рабочей станции Trilux Microbeta. Анализ экспрессии во временно трансфицированных клетках HEK293 использовали в примере 1.

Анализ экспрессии люциферазы Gaussia, находящейся под контролем tTA-чувствительного искусственного промотора "7xTetO-AoHV-1", во временно трансфицированных клетках Vero.

Клетки Vero высевали в многолуночные (на 96 лунок) планшеты при плотности посева 1,25×10<sup>4</sup> клеток/лунка. Клетки трансфицировали через 1 день после посева плазмиды, полученной из pDualLuc, содержащей ген люциферазы Gaussia, находящийся под контролем 7xtetO-AoHV-1. Помимо плазмиды с люциферазой, клетки котрансфицировали плазмидой, кодирующей тетрациклин-индуцируемый белок-трансактиватор (tTA), или плазмидой отрицательного контроля (pBluescript). Трансфекцию клеток осуществляли с помощью липофектамина 3000 в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies). Активность люциферазы измеряли через 24 ч после трансфекции с помощью набора для двойного анализа люциферазы Pierce Gaussia-Firefly (Thermo Scientific) в люминометре для микропланшетов Luminoskan™ Ascent. Для контроля эффективности трансфекции измеряемые единицы люциферазы Gaussia нормализовали по отношению к уровням люциферазы красных светлячков (для чего экспрессионную кассету, управляемую AoHV-1 short, помещали в ту же самую плазмиду pDualLuc). Анализ экспрессии во временно трансфицированных клетках Vero проводили в примере 2.

Анализ экспрессии люциферазы Gaussia, находящейся под контролем вариантов промотора AoHV-1, во временно трансфицированных клетках PER.C6.

Клетки PER.C6 высевали в 96-луночные планшеты при плотности посева 5×10<sup>4</sup> клеток/лунка. Клетки трансфицировали через 1 день после посева с использованием плазмид pDualLuc, содержащих ген люциферазы Gaussia, находящийся под контролем различных вариантов промотора AoHV-1, как описано в примере 6. Трансфекцию клеток осуществляли с помощью липофектамина 2000 CD в соответствии с протоколом производителя (Life Technologies). Активность люциферазы измеряли в клетках, лизированных через 24 ч после трансфекции, с помощью набора для двойного анализа люциферазной активности Pierce Gaussia-Firefly (Thermo Scientific) и люминометра для микропланшетов Luminoskan™ Ascent. Для контроля эффективности трансфекции измеряемые единицы люциферазы Gaussia нормализовали по отношению к уровням люциферазы красных светлячков (для чего экспрессионную кассету, управляемую AoHV-1 short, помещали в ту же самую плазмиду pDualLuc). Данный раздел "Способы" применим к примеру 6.

Клетки PER.C6-hCMV.TetR и PER.C6-AoHV.TetR.

Два типа клеток PER.C6, стабильно экспрессирующих TetR, получали и использовали в данном документе.

Сперва клетки PER.C6-hCMV.TetR, которые экспрессируют TetR, находящийся под контролем промотора hCMV, получали с помощью стабильной трансфекции клеток PER.C6 плазмидой pCDNA6/TR (Thermo Fisher Scientific, № по кат. V102520) в соответствии со стандартными процедурами, описанными в протоколе производителя.

Затем клетки PER.C6-AoHV.TetR, которые экспрессируют TetR, находящийся под контролем короткого промотора AoHV-1, получали с помощью стабильной трансфекции клеток PER.C6 плазмидой

pC\_AoHV\_TetR в соответствии с процедурами, описанными в примере 5 (и разделе "Способы", на которые ссылаются в данном документе).

Получение клеточного клона клеток PER.C6-hCMV. TetR, экспрессирующих дополнительный представляющий интерес ген, находящийся под контролем регулируемого TetR короткого промотора AoHV-1.

Клетки PER.C6-hCMV.TetR высевали за 1 день до трансфекции в колбу с культурой T80. Плазмида, используемая для трансфекции, несла представляющий интерес ген (GOI), находящийся под контролем промотора AoHV.2xtetO (SEQ ID NO:7). Кроме того, она содержала экспрессионную кассету с геном неомидин- фосфотрансферазы II, контролируемым промотором, полученным из SV40. Плазмиду конструировали путем замещения, посредством нескольких стадий клонирования фрагмента MfeI-XbaI, содержащего промотор hCMV, pCDNA2004Neo(-) (№ доступа FB674876 в GenBank) фрагментом, содержащим AoHV.2xtetO, затем кодирующей последовательностью GOI. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen). За день до трансфекции клетки субкультивировали и высевали 1:2, 1:4, 1:8 и 1:16 в 10 см культуральные чашки. Через день после высевания среду для культивирования клеток заменяли средой PER.C6-hCMV.TetR с добавлением 0,5 мг/мл генетицина (Gibco 10131-019). Среду меняли 2 раза в неделю. Клоны отбирали через 2-3 недели после трансфекции. Данный раздел "Способы" применим к примеру 3.

Вестерн-блоттинг для анализа экспрессии представляющего интерес гена.

Высеянные клетки инкубировали в течение 2 дней с доксициклином или без него (1 мкг/мл) и собирали в буфере RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0,5% доксихолат, 0,1% SDS 50 mM Tris-HCL).

Образцы загружали в 10% гель Bis-Tris (Invitrogen NP0301PK2) и проводили хроматографию в буфере MOPS (Invitrogen NP0001). Осуществляли блоттинг геля SDS в системе iBlot2 (Invitrogen) и белки переносили на мембрану из нитроцеллюлозы (Invitrogen IB23001). Мембрану блокировали в течение ночи при 4°C в блокирующем растворе (LI-COR 927-40000). Мембрану для вестерн-блоттинга инкубировали с первичным антителом (1:200, мышинным поликлональным антителом к вирусу Ad35 (внутрилабораторным)) в блокирующем буфере в течение 2 ч и промывали в TBST. Вестерн-блот инкубировали со вторичным антителом (1:5000, козье антитело к иммуноглобулину мыши 800CW) в блокирующем буфере в течение 1 ч и промывали несколько раз TBST. Визуализацию осуществляли на устройстве для визуализации LI-COR Odyssey Imager. Данный раздел "Способы" применим к примеру 3.

Получение плазмиды с двумя люциферазами pDualLuc.

pDualLuc (SEQ ID NO:21) представляет собой плазмиду, несущую две экспрессионные кассеты: первую экспрессионную кассету, экспрессирующую люциферазу Gaussia (Glue) под контролем промотора цитомегаловируса человека (hCMV), и вторую кассету, экспрессирующую люциферазу красного светлячка (RFL) под контролем короткого промотора AoHV-1. В pDualLuc экспрессионные кассеты Glue и RFL расположены в ориентации хвост к хвосту по отношению друг к другу.

pDualLuc получали с помощью нескольких стадий синтеза и субклонирования генов, осуществляемых в GeneArt (Life Technologies). Сначала получали синтетические фрагменты "CMV\_GLuc\_SV" (SEQ ID NO:17) и "AoHV1\_RFL\_BGH" (SEQ ID NO:19), которые несут соответствующие экспрессионные кассеты, и клонировали их в стандартную плазмиду GeneArt (pMK-RQ). Затем синтетический фрагмент AoHV1\_RFL\_BGH дополнительно субклонировали в конструкцию, содержащую CMV\_GLuc\_SV, с использованием сайтов рестрикции MluI и NsiI.

Промоторную последовательность CMV, управляющую люциферазой Gaussia, pDualLuc фланкировали уникальными сайтами рестрикции XhoI и HindIII, обеспечивая замену данного промотора альтернативными промоторными последовательностями, как это осуществляли в данном документе в примерах 2 и 6.

Получение плазмиды pAd26.dE1.dE3.5orf6 с геномом вектора Ad26.

pAd26.dE1.dE3.5orf6 представляет собой плазмиду, содержащую полноразмерный геном вектора Ad26, который несет делецию E1, делецию E3 и замену E4orf6 Ad26 на такую из Ad5, как описано для ранее получаемых векторов на основе Ad26 (Abbink et al., 2007). Плазмидный остов pAd26.dE1.dE3.5orf6 содержит точку инициации репликации pMB1 и ген устойчивости к ампициллину, и он получен из pBR322 (№ доступа в J01749.1 в GenBank). pAd26.dE1.dE3.5orf6 дополнительно содержит уникальный сайт рестрикции AsiSI вместо делеции E1 генома вектора, и уникальный сайт рестрикции Pad между участком E4 и правым инвертированным концевым повтором (RITR) генома вектора. Эти сайты могут быть использованы для вставки трансгенных кассет в соответствующих положениях. В конечном итоге геном аденовирусного вектора в pAd26.dE1.dE3.5orf6 фланкируют на каждом из его концов сайтом рестрикции SwaI, способствуя его высвобождению из плазмидного остова в результате расщепления SwaI.

Конструирование pAd26.dE1.dE3.5orf6 включало несколько стадий синтеза и клонирования. Последовательность размером 2 т. о. (SEQ ID NO:16), содержащую левосторонний и правосторонний фрагмент (необходимого) генома вектора Ad26, синтезировали в GeneArt/LifeTechnologies. Левосторонний фрагмент генома вектора данной последовательности простирается от левого инвертированного концевого повтора (LITR) генома вектора до сайта SfiI включительно, что соответствует сайту SfiI в положениях 3755-3767 генома вируса Ad26 (дикого типа) (№ доступа EF153474.1 в GenBank). Правосторонний фраг-

мент вирусного генома простирается от сайта NheI, соответствующего сайту NheI в положениях 34079-34084 вирусного генома Ad26 дикого типа до правого ITR (RITR) включительно. Синтезированную последовательность конструировали таким образом, что она несла делецию E1 (от положения 472 до 3365 Ad26, № доступа EF153474.1 в GenBank), а также сайты рестрикции, упомянутые выше (т.е. сайт AsiSI вместо делеции E1, сайт PacI между E4 и RITR, и два сайта SmaI, непосредственно фланкирующие последовательности генома вектора). Фрагмент синтеза генов дополнительно содержал два внешних сайта рестрикции для облегчения клонирования: сайт MfeI включали со стороны левого конца, в то время как сайт AseI включали со стороны правого конца. Синтезированный фрагмент лигировали в виде фрагмента рестрикции MfeI-AseI в pBR322, paEcoRI и NdeI (№ доступа J01749.1 в GenBank) (с замещением тем самым фрагмента EcoRI-NdeI pBR322 размером 2,3 т.о., содержащего ген устойчивости к тетрациклину), что приводило к удалению сайтов рестрикции, которые расщепляли с получением соответствующих фрагментов для лигирования. Полученную плазмиду, несущую левые и правые концы генома вектора, в конечном итоге использовали для конструирования pAd26.dE1.dE3.5orf6 с помощью двух последовательных стадий клонирования. Первый рестриционный фрагмент генома вектора SfiI-NheI Ad26 размером 12,7 т. о., полученный из pWE.Ad26.dE3.5orf6 (Abbink et al., 2007), лигировали в "левоконцевую/правоконцевую" плазмиду, расщепленную SfiI и NheI. Второй рестриционный фрагмент генома вектора SfiI-SfiI Ad26 размером 13,7 т.о., полученный из pWE.Ad26.dE3.5orf6, встраивали в сайт SfiI полученной в результате плазмиды с частью генома вектора.

Получение плазмид с геномом вектора Ad26 pAd26.CMV\_GLuc. AoHV1\_RFL и pAd26. CMVtetO\_GLuc. AoHV1\_RFL.

pAd26.CMV\_GLuc.AoHV1 RFL представляет собой плазмиду, содержащую геном вектора Ad26 pAd26.dE1.dE3.5orf6 (см. выше), модифицированный таким образом, что он несет две трансгенные экспрессионные кассеты: (1) экспрессионную кассету с люциферазой Gaussia (Gluc), управляемую промотором цитомегаловируса человека (hCMV), вставленную в (удаленный) участок E1, и (2) экспрессионную кассету с люциферазой красного светлячка (RFL), управляемой промотором AoHV-1, вставленную между E4 и RITR.

pAd26.CMVtetO\_GLuc .AoHV1\_RFL является идентичной pAd26. CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL, помимо того, что она дополнительно несет две тетрациклин-индуцируемые операторные последовательности (tetO) в промоторе hCMV экспрессионной кассеты GLuc.

Конструирование плазмид pAd26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и pAd26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL включало получение промежуточных конструкций, несущих необходимые экспрессионные кассеты, с последующей вставкой этих кассет в геном вектора Ad26 pAd26.dE1.dE3.5orf6 с помощью сборки по Гибсону (Gibson et al., 2009). Промежуточные конструкции, несущие синтетические последовательности "CMV\_GLuc\_SV" (SEQ ID NO:17), "CMVtetO\_GLuc\_SV" (SEQ ID NO:18) и "AoHV1\_RFL\_BGH" (SEQ ID NO:19) получали у компании, предоставляющей услуги по синтезу генов GeneArt (LifeTechnologies). Последовательность CMV GLuc SV содержит экспрессионную кассету для экспрессии GLuc. Она содержит промотор цитомегаловируса человека (hCMV) (SEQ ID NO:4), последовательность, кодирующую Gluc, и сигнальную последовательность полиаденилирования, полученную из SV40. Отличие последовательности CMVtetO\_GLuc\_SV от последовательности CMV GLuc SV заключается в том, что она несет в промоторе, полученном из промотора hCMV, CMVtetO (SEQ ID NO:15), вставку размером 54 п.о., содержащую две тетрациклин-индуцируемые операторные последовательности (tetO). Последовательность AoHV1 RFL BGH содержит экспрессионную кассету для экспрессии RFL. Она содержит короткий AoHV-1 (SEQ ID NO:30), последовательность, кодирующую RFL, и сигнальную последовательность полиаденилирования, полученную из гена бычьего гормона роста. Последовательности CMV GLuc SV и CMVtetO\_GLuc\_SV конструировали таким образом, что они дополнительно содержали короткие фланкирующие последовательности, соответствующие последовательностям, непосредственно фланкирующим сайт AsiSI в pAd26.dE1.dE3.5orf6. Эти фланкирующие последовательности обеспечивают возможность вставки соответствующих экспрессионных кассет в сайт AsiSI pAd26.dE1.dE3.5orf6 (т.е. в местоположение делеции E1 в геноме вектора Ad) с помощью способов сборки in vitro (IVA) (как например, описано Gibson et al. (Gibson et al., 2009). Аналогично последовательность AoHV1\_RFL\_BGH содержит фланкирующие последовательности, которые обеспечивают возможность вставки соответствующей экспрессионной кассеты в сайт Pad pAd26.dE1.dE3.5orf6 (т.е. между участком E4 и RITR генома вектора) с помощью IVA. Все три последовательности дополнительно снабжали фланкирующими внешними сайтами рестрикции, предназначенными для высвобождения этих последовательностей из их соответствующих плазмидных остовов (в составе которых они предоставлены поставщиком услуг по синтезу генов). pAd26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL конструировали путем 4-фрагментной реакции сборки по Гибсону (New England Biolabs) между плазмидой pAd26.dE1.dE3.5orf6, расщепленной с помощью AsiSI, и PacI, и синтезированными последовательностями CMV\_GLuc\_SV и AoHV1\_RFL\_BGH, которые высвобождали из их соответствующих плазмидных остовов путем расщепления с помощью PmlI и PshAI соответственно. pAd26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL получали таким же образом, как и pAd26.dE1.dE3.5orf6, однако с помощью синтезированной последовательности CMVtetO\_GLuc\_SV вместо CMV GLuc SV в реакции сборки по Гибсону.

Праймеры для анализа целостности трансгенных кассет.

Последовательности пары праймеров "E1 PCR":  
 TGGCGCGAAAАСТGAATGAG - прямой (SEQ ID NO:8),  
 GCAGGGCGGGTTGTCAAATAAG - обратный (SEQ ID NO:9)  
 Последовательности пары праймеров "E4 PCR1":  
 GACGGGAGCAATCCCTCCAG - прямой (SEQ ID NO:10),  
 CCCCACAAAGTAAACAAAAG - обратный (SEQ ID NO:11)  
 Последовательности пары праймеров "E4 PCR2":  
 CGTTCTCACTTCCTCGTATC - прямой (SEQ ID NO:12),  
 CAACGCTGATTGGACGAG - обратный (SEQ ID NO:13).

Плазмиды, описанные в данных разделах, используются в примере 4.

Плаزمида с экспрессией TetR pC\_AoHV\_TetR.

Для конструирования pC\_AoHV\_TetR фрагмент ДНК размером 1,3 т.п.о. (SEQ ID NO:20), содержащий короткий AoHV-1 (SEQ ID NO:30), после которого следует кодон-оптимизированная последовательность, кодирующая TetR, синтезировали (в GeneArt/LifeTechnologies), а затем субклонировали в pCDNA20 04Neo(-) (№ доступа в FB674876 в GenBank) с использованием сайтов рестрикции MfeI и XbaI. На фиг. 6А показана карта pC AoHV TetR, на которой указано местоположение вставки размером 1,3 т.п.о.

Процедуры получения клеточных линий PER.C6-AoHV.TetR.

Стабильные клеточные линии PER.C6-AoHV.TetR получали с помощью стандартных процедур получения клеточных линий. Вкратце, клетки PER.C6, выращенные в бессывороточной среде, адаптированные к росту в условиях суспензии (Fallaux et al., 1998), выращивали в среде CDM4 PerMab (HyClone), дополненной 4 мМ L-глутамина (Lonza), трансфицировали плазмидой pC\_AoHV\_TetR путем электропорации с использованием электропоратора BioRad. После извлечения и селекции по устойчивости к антибиотику в "среде для селекции PerMab", т.е. среде CDM4 PerMab, дополненной 4 мМ L-глутамина и 125 мкг/мл генетицина (Gibco), трансфицированные клетки высевали для клонирования одиночных клеток в планшеты MW96 по 1 жизнеспособной клетке на лунку в среде MAb (SAFC), дополненной 4 мМ L-глутамина и 125 мкг/мл генетицина. После образования клеточных колоний выделенные клоны наращивали в течение нескольких пассажей в статических культурах в среде для отбора PerMab. Затем с помощью проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием с использованием антитела к TetR проводили анализ 100 клонов в отношении их способности экспрессировать TetR (Tet03, MoBiTec). В ходе данного первого скрининга было выявлено, что 94 из 100 тестируемых клонов были TetR-позитивными. Из данных TetR-позитивных клонов отбирали 4 7 и после адаптации к росту в среде PerMexcis (Lonza), дополненной 4 мМ L-глутамина и 125 мкг/мл генетицина, тестировали повторно в отношении экспрессии TetR с помощью процедуры проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием, а также в отношении активности TetR с помощью анализа функциональных характеристик TetR (описанно в разделе Способы в данном документе). Затем отбирали 24 TetR-позитивных клона, которые демонстрировали время удвоения популяции, составляющее 30 ч или меньше, и которые проявляли широкий диапазон уровней активности TetR. Эти клоны, обозначенные как клоны №1 и №24 PER.C6-AoHV.TetR, (повторно) адаптировали к росту в смесительных колбах, после чего в завершении их подвергали криоконсервации в клеточных банках малого масштаба для исследований. Данный раздел "Способы" применим к примеру 5.

Стабильность экспрессии TetR в клонах PER.C6-AoHV.TetR.

Проводили анализ стабильности экспрессии TetR из клеточных клонов PER.C6-AoHV.TetR при длительном пассажировании. Клеточные клоны PER.C6-AoHV.TetR выращивали в смесительных колбах с селекцией по устойчивости к антибиотику и без нее в течение нескольких пассажей до достижения примерно 60 удвоений популяции (или поколений). Экспрессию TetR анализировали с помощью проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием в поколениях 20, 40 и 60. В каждой из этих временных точек с клетками каждого клона проводили проточную цитометрию согласно протоколу с внутриклеточным двойным окрашиванием для выявления и TetR, и тубулина. Окрашивание проводили в соответствии со стандартными процедурами проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием и оно включало две стадии инкубации антител: первую с использованием моноклонального мышинового антитела к TetR (Tet03, MoBiTec) и вторую с использованием конъюгата антитела к мышинному IgG-FITC (554001, BD Biosciences) в комбинации с конъюгатом антитела к тубулину-Alexa Fluor 647 (ab195884, Abcam). Для каждого клона определяли фракции TetR-позитивных и негативных клеток в условиях строгого позитивного по тубулину гейтирования. Данный раздел "Способы" применим к примеру 5.

Анализ функциональных характеристик TetR.

Анализ функциональных характеристик TetR проводили после длительного пассажирования кле-

точных клонов PER.C6-АоНВ.ТетR. Клеточные клоны PER.C6-АоНВ.ТетR выращивали в смесительных колбах с селекцией по устойчивости к антибиотику и без нее в течение нескольких пассажей до достижения примерно 60 удвоений популяции (или поколений). Затем клеточные клоны PER.C6-АоНВ.ТетR и контрольные клетки PER.C6 высевали в покрытые поли-L-лизинем многолуночные (96-луночные) планшеты в среде Permexcis, дополненной 4 mM L-глутамин, и через 2 ч после инкубации инфицировали в четырех параллелях векторами Ad26.CMV\_GLuc.АоНВ1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.АоНВ1\_RFL (описано в примере 4). Через день после инфицирования собирали инфицированные клетки в лизирующем буфере Luciferase Cell Lysis Buffer (Pierce/Thermo Scientific). Используя отдельные аликвоты каждого клеточного лизата, затем измеряли активности GLuc и RFL в соответствии с инструкциями производителя с использованием соответственно реагентов из наборов для анализа люциферазной активности BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (NEB) and Luciferase Glow Assay Kit (Pierce/Thermo Scientific), а также люцинометра для микропланшетов Ascent (Thermo Scientific). На повтор инфицирования активность Gluc нормализовали по активности RFL. Данный раздел "Способы" применим к примеру 5.

Пример 1. Идентификация короткого АоНВ-1 в качестве высокоактивного промотора, предназначенного для экспрессии гетерологического гена.

Часто промоторы, полученные из геномов вирусов или животных/человека, используют для экспрессии гетерологических белков, например, в экспрессионных кассетах в плазмидных векторах или вирусных векторах для экспрессии представляющего интерес гена в клетках или организме-хозяине. Промотор, традиционно используемый для этой цели, представляет собой промотор, полученный из промоторного участка гена немедленного-раннего ответа цитомегаловируса человека (hCMV) (Powell et al., 2015). Также известны несколько цитомегаловирусов (CMV), которые инфицируют других хозяев. К примеру, они инфицируют макаков-резусов (rhCMV) (Barry, Alcendor, Power, Kerr, & Luciw, 1996; Chan, Chiou, Huang, & Hayward, 1996; Chang et al., 1993; Hansen, Strelow, Franchi, Anders, & Wong, 2003) и шимпанзе (chCMV) (Chan et al. 1996).

С целью идентификации промотора, который предпочтительно является высокоактивным и коротким, а также имеет низкую идентичность последовательности по отношению к традиционно используемому промотору hCMV, идентифицировали и исследовали несколько предполагаемых промоторных последовательностей. Несколько предполагаемых промоторов, которые исследовали и которые получили из герпесвирусов, находящихся в более дальнем родстве с hCMV, характеризовались очень низкой промоторной активностью или полным ее отсутствием. Промоторную активность подтверждали в случае некоторых других промоторов, полученных из других видов CMV, и которые, как было известно, являются высокоактивными промоторами, однако, к сожалению, такие промоторы зачастую демонстрировали один или несколько недостатков: они характеризовались более крупным размером из-за, например, включения энхансерных и интронных последовательностей, и/или они характеризовались значительной степенью гомологии с промоторной последовательности hCMV.

Aotine herpesvirus 1 (АоНВ-1) предварительно классифицирован как цитомегаловирус. Интересно то, что несмотря на опубликованную полную геномную последовательность АоНВ-1 и что в данной последовательности отмечены открытые рамки считывания (ORF), до сих пор не были описаны главные промоторы гена немедленно-раннего ответа. Исследовали две разные конструкции разной длины участка генома АоНВ-1 и соответствующие предполагаемые промоторные последовательности назвали длинный АоНВ-1 и короткий АоНВ-1. На основании результатов, описанных ниже, в которых показана промоторная активность в случае данных последовательностей, они и их производные обозначены как главный промотор АоНВ-1 гена немедленно-раннего ответа или сокращенно промотор АоНВ-1.

С целью тестирования идентифицированных предполагаемых промоторных последовательностей в плане эффективности экспрессии гетерологических генов предполагаемые промоторные последовательности синтезировали в GeneArt LifeTechnologies и субклонировали в плазмиды pAdapt35.Luc посредством сайтов рестрикции AvrII и HindIII выше репортерного гена люциферазы светлячка. Уровни активности люциферазы светлячка измеряли в клетках HEK293 через 24 ч после трансфекции и сравнивали с экспрессией люциферазы светлячка, индуцированной промотором hCMV (SEQ ID NO:4).

При выборе из панели возможных промоторов выбирали некоторые высокоактивные промоторы (данные не показаны), среди которых короткий chCMV и короткий АоНВ-1 были предпочтительными вследствие их очень маленьких размера и эффективности. Результаты исследования эффективности в случае выбранного короткого промотора АоНВ-1 short (SEQ ID NO:1), длинного АоНВ-1 (SEQ ID NO:2), короткого chCMV (SEQ ID NO:3) и промотора hCMV показаны на фиг. 1. Все промоторы: короткий АоНВ-1, длинный АоНВ-1, короткий chCMV и hCMV характеризовались сопоставимой промоторной активностью в данном эксперименте.

В то же время, как показано на фиг. 2А, короткий chCMV характеризовался очень высокой идентичностью последовательности с последовательностью hCMV в участке выравнивания (идентичностью последовательности, составляющей примерно 64%), в частности, в части, расположенной в 5'-3' направлении от участка короткого промотора chCMV, показана значительная степень совпадения и длинные отрезки с идентичностью последовательности с последовательностью hCMV (с несколькими идентичными отрезками до 19 нуклеотидов и гомологичным отрезком из более 100 нуклеотидов с весьма незна-

чительными отличиями в нуклеотидах). В отличие от этого на фиг. 2В показано, что новый короткий промотор AoHV-1 обладал очень низкой идентичностью последовательности с последовательностью hCMV в участке выравнивания (идентичность последовательности составляла примерно 36%) и эффективностью, которая сопоставима с контрольным hCMV. С учетом потенциальных гомологичных рекомбинаций между гомологичными промоторными участками длина идентичных отрезков в двух последовательностях была более значимой, чем общая гомология последовательностей. Необходимо отметить, что короткий промотор AoHV-1 имел лишь незначительно количество общих коротких отрезков последовательности, идентичных с hCMV, с максимальной длиной 14 нуклеотидов, что, как полагают, является результатом очень низкого риска возникновения гомологичной рекомбинации между промотором hCMV и коротким промотором AoHV-1 по сравнению с промоторами, имеющими более длинные общие отрезки идентичных нуклеотидов или их большее количество, например, (Rubnitz & Subramani, 1984). Таким образом, полагают, что риск возникновения нежелательной гомологичной рекомбинации между короткими промоторами hCMV и AoHV-1 является очень низким. При необходимости и без того весьма ограниченный уровень идентичности последовательности между этими промоторами может быть дополнительно снижен за счет создания одной или нескольких целевых мутаций в каждом промоторе и тестирования с помощью стандартных способов того, что это не устраняет промоторную активность.

В заключение следует отметить, что короткий промотор AoHV-1 является предпочтительным, поскольку он характеризуется очень высокой эффективностью в диапазоне золотого стандарта hCMV, однако в то же время имеет очень короткую последовательность (484 п.о.) и характеризуется низкой идентичностью последовательности с последовательностью промотора hCMV.

Пример 2. Применение корового промотора AoHV-1 в системе на основе низкомолекулярного контролируемого трансактиватора для индуцируемой экспрессии представляющего интерес гена в клетках млекопитающих.

Индукцируемая экспрессия генов может иметь высокую вероятность применения в области биотехнологии, в частности, для временной экспрессии токсических продуктов генов. В определенных традиционно используемых системах для регуляции гетерологичных генов в клетках млекопитающих могут использоваться искусственные промоторы, состоящие из множественных копий операторной последовательности Tet (TetO), связанной с коровым промотором hCMV (Gossen & Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). В этих системах указанные искусственные промоторы, у которых отсутствует или очень низкая базальная транскрипционная активность, могут активироваться за счет специфического связывания с их последовательностями TetO определенных рекомбинантных факторов транскрипции, таких как тетрациклин-индуцируемый белок-трансактиватор (tTA) или обратный тетрациклин-индуцируемый белок-трансактиватор (rtTA). Далее исследовали, можно ли получить такой аналогичный tTA/rtTA-чувствительный искусственный промотор с использованием элемента последовательности промотора AoHV-1 вместо корового промотора hCMV.

С этой целью конструировали промотор, при этом только предполагаемый минимальный (коровый) промотор AoHV-1 размещали непосредственно ниже семи операторных последовательностей Tet (7xTetO-AoHV-1, SEQ ID NO:5). Промоторную последовательность синтезировали в GeneArt Life Technologies и субклонировали в плазмиду pDualLuc, описанную в разделе Способы в данном документе, с использованием сайтов рестрикции XhoI и HindIII, за счет чего заменяли промотор CMV, контролирующей репортерный ген люциферазы Gaussia в данной плазмиде. Уровни активности люциферазы Gaussia измеряли в трансфицированных клетках Vero через 24 ч после трансфекции и сравнивали с экспрессией люциферазы Gaussia тем же самым промотором в присутствии белка-трансактиватора tTA. Данные экспрессии нормализовали по эффективности трансфекции путем измерения активности люциферазы красного светлячка (RFL), находящейся под контролем короткого промотора AoHV-1, для чего экспрессионную кассету встраивали в ту же самую плазмиду pDualLuc. На фиг. 3 показана экспрессия гена люциферазы Gaussia, находящегося под контролем промоторов 7xTetO-AoHV-1. В ходе четырех независимых экспериментов (N=4) базальный уровень экспрессии промотора 7xTetO-AoHV-1 был близким к фоновому уровню (клетки, трансфицированные только средой, отрицательный контроль) и в среднем составлял в 1400 раз ниже, чем при контрансфекции плазмидой, кодирующей белок-трансактиватор tTA (7xTetO-AoHV-1+tTA). При добавлении доксициклина (двукратном, N=2), который ингибирует связывание tTA с последовательностями tetO промотора, снова выявляли базальные уровни экспрессии. Индуцированный уровень экспрессии 7xTetO-AoHV-1 также был сравним с промотором RSV (полученным из LTR вируса саркомы Рауса; который представляет собой другой промотор, описанный для применения в биотехнологических системах экспрессии), указывая на то, что индуцированный промотор 7xTetO-AoHV-1 приводит к более высоким уровням экспрессии люциферазы Gaussia, превышающим 1 log, чем промотор RSV.

В заключение следует отметить, что последовательность, содержащая предполагаемый коровый промотор, полученная из промотора AoHV-1, может быть использован для конструирования искусственного промотора, который является чувствительным к тетрациклин-индуцируемому белку-трансактиватору. Оказалось, что применение данной последовательности в данном контексте обеспечивает возможность жесткого контролируемой регуляции экспрессии представляющего интерес гена. Таким образом, указанная последовательность представляет собой истинный "коровый промотор", определен-

ный в данном документе, как имеющий очень низкую собственную промоторную активность, однако способный управлять высокоактивной экспрессией генов в комбинации с другими регуляторными последовательностями, такими как связывающие сайты для природных или искусственных факторов транскрипции.

Пример 3. Применение промотора AoHV-1 в системе на основе низкомолекулярного контролируемого бактериального белка-репрессора для регулируемой экспрессии представляющего интерес гена в клетках млекопитающих.

Как упомянуто в примере 2, регулируемая экспрессия, к примеру, представляющего интерес токсического гена в клеточной линии может быть необходимой для рекомбинантного продуцирования белков или вирусных векторов. В том случае, если используется вирусный вектор, который уже содержит экспрессионную кассету с промотором hCMV, тогда желательно использовать эффективный промотор с другой последовательностью для экспрессии представляющего интерес гена (GOI) в клеточной линии-продуценте. С целью идентификации альтернативы промотору hCMV короткий промотор AoHV-1 и промотор фосфоглицераткиназы 1 человека (hPGK) (другой промотор, описанный для применения в биотехнологических системах экспрессии) тестировали в отношении временной экспрессии eGFP в клетках PER.C6. В соответствии с результатами из примера 1 снова было показано, что короткий промотор AoHV-1 является высокоактивным промотором для экспрессии гетерологичного гена, управляющим уровнями экспрессии eGFP аналогично hCMV (of SEQ ID NO:4) и в значительно более высокой степени, чем при использовании промотора hPGK (SEQ ID NO:6) (фиг. 4A).

В дальнейшем промотор AoHV-1 short, который обычно является конститутивно активным (см., пример 1 и первую часть данного примера), конструировали в качестве промотора, регулируемого белком-репрессором, индуцируемого тетрациклином (TetR), путем вставки двух операторных последовательностей Tet ниже ТАТА-бокса и выше сайта инициации транскрипции (TSS) короткого промотора AoHV-1 (AoHV.2xtetO, SEQ ID NO:7). Как было показано ранее, данная конструкция функционирует в качестве промотора hCMV (например, см. WO 1999/000510 A1). Промотор является активным в клетках, которые не экспрессируют TetR. В данной конструкции промоторная активность репрессируется в присутствии TetR, например, в клеточных линиях, экспрессирующих TetR. Экспрессию можно уменьшить путем добавления доксициклина (Dox), который обладает высокой аффинностью к белку TetR. На фиг. 4B показано, что экспрессия eGFP, клонированного в 5'-3' направлении от AoHV.2xTetO, действительно репрессировалась в клетках PER.C6-hCMV.TetR. Добавление Dox приводит к повышению уровней экспрессии белка eGFP аналогично уровням экспрессии eGFP, управляемой hCMV.

Для получения стабильных клеточных клонов, которые демонстрируют регулируемую TetR экспрессию представляющего интерес гена, клетки PER.C6-hCMV.TetR, экспрессирующие TetR, находящийся под контролем промотора hCMV, трансфицировали плазмидой, экспрессирующей представляющий интерес ген под контролем AoHV.2xtetO. Отбирали восемьдесят пять клонов с использованием сред для селекции по устойчивости к антибиотику. В данном эксперименте два клон отбирали для тестирования индуцируемой экспрессии представляющего интерес гена (GOI). На фиг. 4C показано тестирование двух выбранных клонов для индуцируемой экспрессии GOI. На вестерн-блоттинге можно отметить, что оба тестируемых клон характеризуются низким фоновым сигналом в отсутствие Dox, в то время как в присутствии Dox GOI активно экспрессируется. В качестве положительного контроля использовали клетки, временно трансфицированные плазмидой, экспрессирующей GOI под контролем короткого промотора AoHV-1. Положительный контроль характеризуется более высокими уровнями экспрессии GOI, чем клеточные клоны, что обычно наблюдается при получении стабильных клеточных линий.

Альтернативный бактериальный регулируемый репрессором промотор, в котором последовательность куматного оператора (CuO) размещали непосредственно ниже (предполагаемой) инициаторной последовательности короткого промотора AoHV-1, также конструировали и тестировали, и также было доказано, что он является функционально способным (данные не показаны). При конструировании данного промотора белок-репрессор SumR может связывать последовательности CuO и за счет этого подавлять экспрессию.

Кроме того, аналогично описанным системам на основе промотора AoHV1, регулируемого TetR и SumR, получали короткий промотор AoHV-1, содержащий Lac-оператор (LacO), и было доказано, что он в значительной степени репрессируется Lac-репрессором (LacR) (данные не показаны).

В заключение следует отметить, что данный пример подтверждает высокую эффективность короткого промотора AoHV-1 по сравнению с другими традиционно используемыми промоторами для экспрессии гетерологичных генов. Кроме того, получали варианты промотора AoHV-1, регулируемые TetR, SumR и LacR, которые обеспечивают возможность регулируемой экспрессии GOI в клетках млекопитающих. Например, это может использоваться с целью экспрессии белков, являющихся токсичными для клетки, или для экспрессии белков, которые приводят к нестабильности клеточных линий или векторов.

Пример 4. Применение промотора AoHV-1 в вирусных векторах с двумя экспрессионными кассетами.

Короткий промотор AoHV-1 (AoHV-1 short) можно использовать в вирусных векторах для управления экспрессией вакцинных антигенов или других представляющих интерес белков. Это проиллюстри-

ровано в данном документе путем использования короткого AoHV-1 в контексте аденовирусных векторов Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL. Они представляют собой два рекомбинантных аденовирусных вектора на основе Ad26, каждый из которых несет две экспрессионные кассеты, первую кассету, кодирующую люциферазу Gaussia (GLuc), вставленную вместо (удаленного) участка E1, и вторую кассету, кодирующую люциферазу красного светлячка (RFL), расположенную между участком E4 и правым инвертированным концевым повтором (RITR). Экспрессионные кассеты Gluc в этих двух вирусах управляются промотором hCMV (SEQ ID NO:4) и CMVtetO (SEQ ID NO:15) соответственно. Отличие CMVtetO от промотора hCMV заключается в том, что он несет вставку последовательности, содержащей два мотива контролируемой тетрациклином операторной последовательности (TetO), что делает этот промотор репрессируемым с помощью тетрациклин-индуцируемого белка-репрессора (TetR). В обоих вирусах экспрессионная кассета RFL находится под контролем короткого AoHV-1 (SEQ ID NO:30). См. фиг. 5A в отношении схематического представления геномов этих двух векторов.

Два вышеуказанных вектора получали путем трансфекции полногеномных плазмид pAd26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и pAd26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL, описанных в разделе Способы в данном документе, в клетки PER.C6. Эти трансфекции осуществляли в соответствии со стандартными процедурами с использованием реагента для трансфекции липофектамин 2000 (Invitrogen) и 4 мкг расщепленной SmaI плазмидной ДНК на одну трансфекцию в колбе T25 для культуры клеток тканей, в которую днем ранее высевали клетки PER.C6 в количестве  $3 \times 10^6$  на колбу. (Расщепление с помощью SmaI необходимо для высвобождения генома аденовирусного вектора из плазмидного остова). После сбора спасенных после трансфекции вирусов их дополнительно размножали с помощью нескольких последовательных стадий инфицирования клеток PER.C6 до тех пор, пока не осуществляли инфицирование с целью получения вирусов в больших масштабах при количестве пассажей вируса (VPN) после трансфекции, составляющем 5. Вирусы очищали от собранных нерасщепленных остатков вирусов с помощью двухстадийной процедуры ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия (CsCl), как описано ранее (Navenga et al., 2006). Вирусы количественно определяли с помощью процедуры на основе спектрофотометрии для определения титра вирусных частиц (VP), а также с помощью анализа TCID50 для определения титра инфекционных единиц (IU), в обоих случаях так, как это описано ранее (Maizel, White, & Scharff, 1968).

Результаты количественного определения VP и IU для очищенных порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL показаны в табл. 1. Выход вирусов, а также соотношения VP и IU, полученные для данных двух порций, находятся в том же диапазоне, как и такие показатели, которые обычно получают для стандартных векторов на основе Ad26, содержащих экспрессионные кассеты с одним трансгеном. Например, оба соотношения VP и IU, получаемые для порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL, т.е. 2/3 и 1/4, находятся в диапазоне соотношений VP и IU, составляющих 18, 11, 24, 10, 12, и 26, которые ранее были описаны для панели векторов на основе Ad26 с использованием экспрессионных кассет с разными (отдельными) трансгенами (Zahn et al., 2012).

Ранее было описано, что применение двух идентичных промоторов для экспрессии двух трансгенов из участка E1 аденовируса может приводить к генетической нестабильности, предположительно в результате гомологичной рекомбинации (см., например, (Belousova et al., 2006) и пример 2 WO 2016166088 A1). Чтобы проверить существование возможности решения этой проблемы с помощью комбинации промотора AoHV-1 по настоящему изобретению в одной и той же системе, что и промотор hCMV в положении E1 и E4 gITR соответственно, исследовали целостность трансгенной кассеты в случае данной комбинации. Целостность трансгенной (TG) кассеты подтверждали для двух очищенных порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL с помощью амплификации на основе ПЦР с последующим секвенированием участков вставки трансгенной кассеты (фиг. 5B). В частности, ПЦР осуществляли для амплификации кассеты TG, вставленной в E1 ("E1 PCR")/ и две ПЦР осуществляли с нацеливанием на кассету TG между E4 и RITR ("E4 PCR1" и "E4 PCR2"). Все праймеры, используемые в данных ПЦР, являются комплементарными Ad26-специфическим последовательностям (т.е. их не подвергали отжигу с последовательностями, расположенными в пределах самих соответствующих кассет TG). Все ПЦР приводили к образованию продуктов предполагаемых размеров, при этом не выявляли какие-либо продукты меньшего размера, указывающие на делеции. Секвенирование продуктов ПЦР также не выявило каких-либо мутаций. Таким образом, комбинация промотора AoHV-1 по настоящему изобретению и промотора hCMV в одном векторе давала генетически стабильные векторы.

В конечном итоге очищенные порции Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL тестировали в отношении их способностей экспрессировать две люциферазы, которые они кодируют. С этой целью линию клеток A549 человека инфицировали при различных показателях множественности заражения, вызываемого двумя вирусами, и активность GLuc и RFL выявляли в образцах, собранных через два дня. Результаты показывают, что оба вектора были способны экспрессировать и GLuc, и RFL (фиг. 5C и D). Это указывает на то, что рассматриваемые конфигурации трансгенных экспрессионных кассет являются полностью функциональными в контекстах аденовирусных геномов, в ко-

торых их исследуют.

В заключение следует отметить, что короткий AoHV-1 можно использовать в качестве промотора для управления экспрессией представляющего интерес белка из трансгенных экспрессионных кассет, вставленных в вирусный вектор. Это показано на примере выше, где короткий AoHV-1 использовали для экспрессии RFL в контексте двух аденовирусных векторов, каждый из которых содержал две отдельные трансгенные экспрессионные кассеты, вставленные в различных местоположениях в геноме аденовирусного вектора. Эти аденовирусные векторы с легкостью получали и они продемонстрировали возможность по их получения в масштабе порций очищенных векторов с высоким титром, характеризующихся высокими соотношениями VP и IU и несущих генетически и функционально интактные трансгенные экспрессионные кассеты.

Пример 5. Применение промотора AoHV-1 в плазмиде для стабильной экспрессии представляющего интерес гена в клетках.

Промотор AoHV-1 можно применять с целью управления экспрессией гетерологичных генов в стабильных клеточных линиях. Это проиллюстрировано в данном документе путем получения TetR-экспрессирующих клеточных линий с использованием рС\_AoHV\_TetR, плазмиды, в которой экспрессия гена TetR управляется промотором AoHV-1.

рС\_AoHV\_TetR показана на фиг. 6А и описана в разделе Способы в данном документе. Она содержит TetR-кодирующую экспрессионную кассету, находящуюся под контролем промотора AoHV-1, и экспрессионную кассету с геном неомицин-фосфотрансферазы II, находящимся под контролем промотора, полученного из SV40. Последняя кассета обеспечивает возможность отбора стабильно трансфицированных клеток с помощью среды для роста клеток, дополненной генетицином.

Как дополнительно описано в разделе Способы в данном документе под названием "Процедуры получения клеточной линии PER.C6-AoHV.TetR", рС\_AoHV\_TetR использовали для стабильных трансфекций линии клеток человека PER.C6. Это приводило после клонирования одиночных клеток к эффективному получению множественных TetR-экспрессирующих клеточных клонов "PER.C6-AoHV.TetR". Было обнаружено, что 94 из 100 тестированных клонов, устойчивых к генетицину, были позитивными в отношении экспрессии TetR в первой стадии скрининга на основе протокола проточной цитометрии с использованием внутриклеточного окрашивания для выявления TetR (данные не показаны). После второй стадии скрининга 4 7 данных TetR-позитивных клонов (данные не показаны), а именно выборку из 24 клонов подвергали криоконсервации в исследовательских клеточных банках малого объема.

Двенадцать из криоконсервированных клонов PER.C6-AoHV.TetR дополнительно оценивали в отношении их функциональных характеристик роста после размораживания в смесительных колбах и их способности экспрессировать (функциональный) TetR при длительном пассажировании (до 60 удвоенных популяций) в обоих случаях как в присутствии, так и в отсутствии селекции с помощью генетицина. Было обнаружено, что все клоны выросли по меньшей мере также эффективно и с аналогичной жизнеспособностью, как и контрольная клеточная линия PER.C6 в исходной суспензии (данные не показаны). Анализ экспрессии TetR с помощью проточной цитометрии с использованием внутриклеточного окрашивания дополнительно продемонстрировал, количество TetR-позитивной фракции клеток оставалось высоким (т.е. 97% или выше) в процессе всего эксперимента с длительным пассажированием. Это показано на фиг. 6В для трех иллюстративных клонов (клоны 1-3 PER.C6-AoHV.TetR). В конечном итоге анализ функциональных характеристик TetR продемонстрировал, что все двенадцать клонов характеризовались значительной активностью репрессии, опосредованной TetR, после их длительного пассажирования, что показано на фиг. 6С для клонов 1-3 PER.C6-AoHV.TetR. В частности, в поколении 60 все двенадцать клонов PER.C6-AoHV.TetR сохраняли способность к репрессированию экспрессию репортерного гена, кодируемого аденовирусным вектором, управляемого TetR-регулируемым промотором. Уровни репрессии, выявленные для 12 различных клонов, были аналогичными (или выше) уровням(уровней) репрессии у клеточной линии положительного контроля (PER.C6-hCMV.TetR), полученной с помощью ранее описанной TetR-экспрессирующей плазмиды рCDNA6/TR, плазмиды, содержащей экспрессионную кассету TetR, контролируемую промотором CMV человека.

В заключении следует отметить, что были успешно получены клеточные линии sPER.C6-AoHV.TetR, в которых экспрессия TetR управляется промотором AoHV1. Это является одним из неограничивающих примеров стабильной экспрессии представляющего интерес белка после интеграции трансгена, функционально связанного с промотором AoHV-1 в соответствии с настоящим изобретением, в геном клетки-хозяина.

Пример 6. Конструирование различных вариантов промотора AoHV-1.

С целью картирования существенно важных частей регуляторного участка главного промотора AoHV-1 гена немедленного-раннего ответа для экспрессии гетерологичных генов получали панель различных вариантов промотора AoHV-1. Различные разработки представлены на фиг. 7А. Две конструкции создавали с усечением уже очень короткой последовательности короткого AoHV-1 с целью картирования необходимых частей этой последовательности короткого промотора. Другие конструкции включали дополнительные предполагаемые домены и сайты связывания с клеточными факторами и предполагаемые интронные последовательности с целью исследования возможности повышения эффективности

## AoHV-1 short.

Тестируемые варианты промоторов представляли собой варианты под названиями v00-v09 и представлены ниже:

- v00: SEQ ID NO:30 (с нативным сайтом AvrII).
- v01: SEQ ID NO:22.
- v02: SEQ ID NO:23.
- v03: SEQ ID NO:24.
- v04: SEQ ID NO:25.
- v05: SEQ ID NO:26.
- v06: SEQ ID NO:1 (сайт AvrII удален за счет однонуклеотидной вставки цитозина (с) в положении нуклеотида 360).
- v07: SEQ ID NO:27.
- v08: SEQ ID NO:28.
- v09: SEQ ID NO:29.

Промоторную активность тестировали с помощью временной трансфекции плазмид в клетки PER.C6. Различные варианты промоторов управляли экспрессией люциферазы Gaussia в плазмиде pDualLuc, описанной в разделе Способы в данном документе. На фиг. 7B показаны результаты исследования эффективности промоторов в сравнении с активностью AoHV-1 (вариантом 00). Эксперимент осуществляли дважды. Каждое отдельное значение рассчитывали по отношению к среднему v00 в том же самом эксперименте. Значения из двух экспериментов объединяли с целью расчета среднего и стандартного отклонения, которые показаны по отношению к v00 AoHV-1 short. Полагают, что активность v00 и v06 (короткий AoHV-1 с сайтом AvrII и соответственно без него) находилась в том же самом диапазоне.

Интересно, что усеченный вариант 04 характеризовался промоторной активностью, сопоставимой с коротким AoHV-1 (вариант 00 и 06). Длина данного варианта 04 составляет только 371 нуклеотид. В отличие от этого, дополнительный усеченный вариант 05 длиной в 241 нуклеотид характеризовался сниженной активностью по сравнению с AoHV-1 short, что можно объяснить отсутствием нескольких предполагаемых сайтов связывания клеточных факторов. Данный вариант промотора 05 по-прежнему мог считаться высокоактивным промотором. Предполагается, что активность промотора снижалась постепенно в ходе осуществления дополнительных усечений.

Показатели активности большинства вариантов промоторов, каждый из которых содержал удлиненные участки по отношению к короткому промотору AoHV-1, находились в диапазоне короткого промотора AoHV-1. Из этих удлиненных вариантов промотора AoHV-1 только v03 (данные не показаны) продемонстрировал значительное снижение промоторной активности по сравнению с AoHV-1 short, однако это можно объяснить присутствием неполной интронной последовательности в v03: несмотря на то, что v03 нес в своем удлиненном участке предполагаемый сайт донора сплайсинга, у него отсутствовали предполагаемые сайты акцептора сплайсинга, расположенные далее в 5'-3' направлении. В отличие от этого, каждый из удлиненных вариантов промотора AoHV-1 v07, v08 и v09, каждый из которых нес по меньшей мере один предполагаемый сайт акцептора сплайсинга, расположенный в 5'-3' направлении от (любого из) их предполагаемых сайтов донора сплайсинга, продемонстрировал экспрессию в диапазоне короткого промотора AoHV-1. Последовательность v09 представляла собой делеционный мутант v07; v09 по сравнению с v07 нес внутреннюю делецию, которая оставляла интактными определенные предполагаемые последовательности донора и акцептора сплайсинга. Данные показывают, что v09 представлял собой пример короткого, но высокоактивного варианта промотора AoHV-1, содержащего предполагаемый интрон. Можно предположить, что аналогично короткий, но высокоактивный промотор, содержащий интрон, можно получить в результате использования аналогичной делеции (в качестве указанной внутренней делеции задействованной в отношении v07) в отношении варианта v08 промотора AoHV-1.

Также конструировали две дополнительные последовательности промотора AoHV-1, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и их тестировали в отношении способности управлять экспрессией представляющего интереса гена. По сравнению с коротким AoHV-1 (т.е. SEQ ID NO: 30) каждая из этих двух последовательностей несет 3'-усечение длиной 84 п.о., кроме того, соответственно 2 и 7 однонуклеотидных замен в пределах своего корового участка промотора AoHV-1. Результатом указанного 3'-усечения было то, что и SEQ ID NO: 33, и SEQ ID NO: 34 содержат только 1 нуклеотид в AoHV-1 в 5'-3' направлении от предполагаемой инициаторной последовательности промотора AoHV-1.

SEQ ID NO: 33 функционально связывали с TetR-кодирующей последовательностью путем ее вставки в виде части синтезированного генного фрагмента в плазмиду pC AoHV TetR (описанную в разделе Способы в данной документе), заменяя короткий промотор AoHV-1 этой плазмиды. Временные

трансфекции клеток PER.C6 с последующим иммуноблоттингом клеточных лизатов с использованием моноклонального антитела к TetR (TetR03, MoBiTec) впоследствии продемонстрировали, что промоторная активность SEQ ID NO:33 была аналогичной такой активности у короткого промотора AoHV-1 (данные не показаны).

SEQ ID NO: 34 функционально связывали с RFL-кодирующей последовательностью с помощью клонирования синтезированного генного фрагмента в рDualLuc (описанную в разделе Способы в данном документе) с использованием сайтов рестрикции AvrII и AscI. Эксперименты по временной трансфекции в клетках PER.C6 с последующим измерением активности RFL в клеточных лизатах впоследствии продемонстрировали, что SEQ ID NO:34 представляет собой функциональную промоторную последовательность (данные не показаны).

Активность этих вариантов промоторов продемонстрировала, что для промоторной активности не требуется включения последовательностей AoHV-1 в 5'-3' направлении от первого нуклеотида 3' предполагаемой Inr (т.е. нуклеотида 399 в последовательности под SEQ ID NO: 30, что соответствует нуклеотиду 287 в последовательности под SEQ ID NO: 25).

Вывод.

Как описано выше, короткий и высокоактивный промотор был идентифицирован в Aotine herpesvirus-1. Промотор AoHV-1 имеет короткую последовательность и характеризуется эффективностью, которая сопоставима с промотором hCMV. Эти свойства делают промотор AoHV-1 идеальным промотором для применения в качестве заместителя в любой ситуации, при которой используется промотор hCMV. Кроме того, промотор AoHV-1 характеризуется сравнительно низкой идентичностью последовательности по отношению к промотору hCMV, что делает его подходящим для применения в комбинации с промотором hCMV при экспрессии двух разных трансгенов из одного и того же вирусного вектора или при получении вирусов с использованием линий клеток-продуцентов, которые также могут содержать аналогичные последовательности. Промотор AoHV-1 также является подходящим для применения с регуляторными последовательностями, которые могут быть использованы для модуляции транскрипции с промотора AoHV-1.

В таблице показаны результаты количественной оценки для очищенных порций Ad26.CMV\_GLuc.AoHV1\_RFL и Ad26.CMVtetO\_GLuc.AoHV1\_RFL.

	Титр вирусных частиц (VP/мл)	Титр инфекционных единиц (IU/мл)	Соотношение VP и IU	Общий выход вирусов (VP) *	Относительный выход вирусов (VP/см <sup>2</sup> ) **
Ad26.CMV_GLuc.AoHV1_RFL	2,2E+12	9,8E+10	23	7,2E+13	3,6E+9
Ad26.CMVtetO_GLuc.AoHV1_RFL	1,4E+12	9,8E+10	14	2,8E+13	2,4E9
* Получение Ad26.CMV_GLuc.AoHV1_RFL осуществляли в 20 колбах T1000, засеянных PER.C6 (с площадью поверхности роста 1000 см <sup>2</sup> на колбу). * Получение Ad26.CMVtetO_GLuc.AoHV1_RFL осуществляли в 20 колбах T600, засеянных PER.C6 (с площадью поверхности роста 600 см <sup>2</sup> на колбу). **Выход вирусов по отношению к площади поверхности роста.					

Ссылочные материалы.

Патентные документы США.

US5057540A (10/15/1991). "Saponin adjuvant". Kensil, Charlotte A.; Marciani, Dante J.

US5122458A (6/16/1992). "Use of a bGH gDNA polyadenylation signal in expression of non-bGH polypeptides in higher eukaryotic cells". Post, Leonard E.; Palermo, Daniel P.; Thomsen, Darrell R.; Rottman, Fritz M.; Goodwin, Edward C.; Woychik, Richard P.

US5559099A (9/24/1996). "Penton base protein and methods of using same". Wickham, Thomas J.; Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.; McVey, Duncan L.; Brader, Joseph T.

US5837511A (11/17/1998). "Non-group C adenoviral vectors". Falck Pedersen, Erik S.; Crystal, Ronald G.; Mastrangeli, Andrea; Abrahamson, Karil

US5837520A (11/17/1998). "Method of purification of viral vectors". Shabram, Paul W.; Huyghe, Bernard G.; Liu, Xiaodong; Shepard, H. Michael

US5846782A (12/8/1998). "Targeting adenovirus with use of constrained peptide motifs". Wickham, Thomas J.; Roelvink, Petrus W.; Kovesdi, Imre

US5851806A (12/22/1998). "Complementary adenoviral systems and cell lines". Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.; McVey, Duncan L.; Bruder, Joseph T.; Lizonova, Alena

US5891690A (4/6/1999). "Adenovirus E1-complementing cell lines". Massie, Bernard

US5965541A (10/12/1999). "Vectors and methods for gene transfer to cells". Wickham, Thomas J.; Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.

US5981225A (11/9/1999). "Gene transfer vector, recombinant adenovirus particles containing the same, method for producing the same and method of use of the same". Kochanek, Stefan; Schiedner, Gudrun

US5994106A (11/30/1999). "Stocks of recombinant, replication-deficient adenovirus free of replication-competent adenovirus". Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.; McVey, Duncan

L.; Bruder, Joseph T.; Lizonova, Alena

US5994128A (11/30/1999). "Packaging systems for human recombinant adenovirus to be used in gene therapy". Fallaux, Frits Jacobus; Hoeben, Robert Cornelis; Van der Eb, Alex Jan; Bout, Abraham; Valerio, Domenico

US6020191A (2/1/2000). "Adenoviral vectors capable of facilitating increased persistence of transgene expression". Scaria, Abraham; Gregory, Richard J.; Wadsworth, Samuel C.

US6040174A (3/21/2000). "Defective adenoviruses and corresponding complementation lines". Imler, Jean Luc; Mehtali, Majid; Pavirani, Andrea

US6083716A (7/4/2000). "Chimpanzee adenovirus vectors". Wilson, James M.; Farina, Steven F.; Fisher, Krishna J.

US6113913A (9/5/2000). "Recombinant adenovirus". Brough, Douglas E.; Kovesdi, Imre

US6225289B1 (5/1/2001). "Methods and compositions for preserving adenoviral vectors". Kovesdi, Imre; Ransom, Stephen C.

US6261823B1 (7/17/2001). "Methods for purifying viruses". Tang, John Chu Tay; Vellekamp, Gary; Bondoc, Jr., Laureano L.

US6485958B2 (11/26/2002). "Method for producing recombinant adenovirus". Blanche, Francis; Guillaume, Jean Marc

US7326555B2 (2/5/2008). "Methods of adenovirus purification". Konz, Jr., John O.; Lee, Ann L.; To, Chi Shung Brian; Goerke, Aaron R

US7501129B2 (3/10/2009). "Vectors comprising guinea pig CMV regulatory elements". Williams, Steven Geraint; Irvine, Alistair Simpson; Gawn, Jonathan

US8932607B2 (1/13/2015). "Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends". Custers, Jerome H. H. V.; Vellinga, Jort

#### Европейские патентные документы.

EP1230354B1 (1/7/2004). "PERMANENT AMNIOCYTE CELL LINE, THE PRODUCTION THEREOF AND ITS USE FOR PRODUCING GENE TRANSFER VECTORS". KOCHANEK, Stefan; SCHIEDNER, Gudrun

EP1601776B1 (7/2/2008). "EXPRESSION VECTORS COMPRISING THE MCMV IE2 PROMOTER". CHATELLARD, Philippe; IMHOF, Markus

EP853660B1 (1/22/2003). "METHOD FOR PRESERVING INFECTIOUS RECOMBINANT VIRUSES, AQUEOUS VIRAL SUSPENSION AND USE AS MEDICINE". SENE, Claude

#### Публикации международных патентных заявок.

WO1999000510A1 (1/7/1999). "REGULATION OF TRANSCRIPTION IN MAMMALIAN CELLS AND VIRAL REPLICATION BY A TETRACYCLIN REPRESSOR". Feng Yao

WO2003049763A1 (6/19/2003). "COMPOSITION FOR THE PRESERVATION OF VIRUSES". SETIAWAN, Kerrie; CAMERON, Fiona, Helen

WO2003061708A1 (7/31/2003). "STABILIZED FORMULATIONS OF ADENOVIRUS". PUNGOR, Erno

WO2003078592A2 (9/25/2003). "METHOD FOR THE PURIFICATION, PRODUCTION AND FORMULATION OF ONCOLYTIC ADENOVIRUSES". MEMARZADEH, Bahram; PENNATHUR-DAS, Rukmini; WYPYCH, Joseph; YU, De Chao

WO2003104467A1 (12/18/2003). "MEANS AND METHODS FOR THE PRODUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS". VOGELS, Ronald; BOUT, Abraham

WO2004001032A2 (12/31/2003). "STABLE ADENOVIRAL VECTORS AND METHODS FOR PROPAGATION THEREOF". VOGELS, Ronald; HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; ZUIJDGEEST, David, Adrianus, Theodorus

WO2004004762A1 (1/15/2004). "ISCOM PREPARATION AND USE THEREOF". MOREIN, Bror; LÖVGREN BENGTTSSON, Karin

WO2004020971A2 (3/11/2004). "CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR ADENOVIRUS PURIFICATION". SENESAC, Joseph

WO2004037294A2 (5/6/2004). "NEW SETTINGS FOR RECOMBINANT ADENOVIRAL-BASED VACCINES". HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; HOLTERMAN, Lennart; KOSTENSE, Stefan; PAU, Maria, Grazia; SPRANGERS, Mieke, Caroline; VOGELS, Ronald

WO2004055187A1 (7/1/2004). "RECOMBINANT VIRAL-BASED MALARIA VACCINES". PAU, Maria Grazia; HOLTERMAN, Lennart; KASPERS, Jorn; STEGMANN, Antonius, Johannes, Hendrikus

WO2005002620A1 (1/13/2005). "QUIL A FRACTION WITH LOW TOXICITY AND USE THEREOF". MOREIN, Bror; LÖVGREN BENGTTSSON, Karin; EKSTRÖM, Jill; RANLUND, Katarina

WO2005071093A2 (8/4/2005). "CHIMPANZEE ADENOVIRUS VACCINE CARRIERS". CIRILLO, Agostino; COLLOCA, Stefano; ERCOLE, Bruno, Bruni; MEOLA, Annalisa; NICOSIA, Alfredo; SPORENO, Elisabetta

WO2005080556A2 (9/1/2005). "VIRUS PURIFICATION METHODS". WEGGEMAN, Miranda; VAN CORVEN, Emile Joannes Josephus Maria

WO2006053871A2 (5/26/2006). "MULTIVALENT VACCINES COMPRISING RECOMBINANT VIRAL VECTORS". HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; VOGELS, Ronald; SADOFF, Jerald; HONE, David; SKEIKY, Yasir Abdul Wahid; RADOSEVIC, Katarina

WO2006108707A1 (10/19/2006). "VIRUS PURIFICATION USING ULTRAFILTRATION". WEGGEMAN, Miranda

WO2006120034A1 (11/16/2006). "VACCINE COMPOSITION". ERTL, Peter, Franz; TITE, John, Philip; VAN WELY, Catherine Ann

WO2007073513A2 (6/28/2007). "METHOD FOR PROPAGATING ADENOVIRAL VECTORS ENCODING INHIBITORY GENE PRODUCTS". GALL, Jason, G., D.; BROUGH, Douglas, E.; RICHTER, King, C.

WO2007100908A2 (9/7/2007). "CHIMERIC ADENOVIRAL VECTORS". TUCKER, Sean, N.

WO2007104792A2 (9/20/2007). "RECOMBINANT ADENOVIRUSES BASED ON SEROTYPE 26 AND 48, AND USE THEREOF". BAROUCH, Dan H.; HAVENGA, Menzo Jans Emko

WO2007110409A1 (10/4/2007). "COMPOSITIONS COMPRISING A RECOMBINANT ADENOVIRUS AND AN ADJUVANT". HAVENGA, Menzo Jans Emko; RADOSEVIC, Katarina

WO2009026183A1 (2/26/2009). "USE OF CHIMERIC HIV/SIV GAG PROTEINS TO OPTIMIZE VACCINE-INDUCED T CELL RESPONSES AGAINST HIV GAG". NABEL, Gary, J.; YANG, Zhi-Yong; SHI, Wei; BAROUCH, Dan, H.

WO2009117134A2 (9/24/2009). "AEROSOLIZED GENETIC VACCINES AND METHODS OF USE". ROEDERER, Mario; RAO, Srinivas; NABEL, Gary, J.; ANDREWS, Charla, Anne

WO2010085984A1 (8/5/2010). "SIMIAN ADENOVIRUS NUCLEIC ACID- AND AMINO ACID-SEQUENCES, VECTORS CONTAINING SAME, AND USES THEREOF". COLLOCA, Stefano; NICOSIA, Alfredo; CORTESE, Riccardo; AMMENDOLA, Virginia; AMBROSIO, Maria

WO2010086189A2 (8/5/2010). "SIMIAN ADENOVIRUS NUCLEIC ACID-

AND AMINO ACID-SEQUENCES, VECTORS CONTAINING SAME, AND USES THEREOF". COLLOCA, Stefano; NICOSIA, Alfredo; CORTESE, Riccardo; AMMENDOLA, Virginia; AMBROSIO, Maria

WO2010096561A1 (8/26/2010). "SYNTHETIC HIV/SIV GAG PROTEINS AND USES THEREOF". NABEL, Gary J.; YANG, Zhi-yong; SHI, Wei; BAROUCH, Dan H.

WO2011045378A1 (4/21/2011). "METHOD FOR THE PURIFICATION OF ADENOVIRUS PARTICLES". DE VOCHT, Marcel, Leo; VEENSTRA, Marloes

WO2011045381A1 (4/21/2011). "PROCESS FOR ADENOVIRUS PURIFICATION FROM HIGH CELL DENSITY CULTURES". DE VOCHT, Marcel, Leo; VEENSTRA, Marloes

WO2013139911A1 (9/26/2013). "VACCINE AGAINST RSV". RADOSEVIC, Katarina; CUSTERS, Jérôme H.H.V.; VELLINGA, Jort; WIDJOJOATMODJO, Myra N.

WO2013139916A1 (9/26/2013). "VACCINE AGAINST RSV". RADOSEVIC, Katarina; CUSTERS, Jérôme H.H.V.; VELLINGA, Jort; WIDJOJOATMODJO, Myra, N.

WO 2016166088A1 (10/20/2016). "RECOMBINANT ADENOVIRUS EXPRESSING TWO TRANSGENES WITH A BIDIRECTIONAL PROMOTER". Kerstin Wunderlich, Jérôme H H V CUSTERS, Jort Vellinga, Barbara Petronella SANDERS.

#### Другие ссылочные документы.

##### Книги.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995)

Ausubel F.M., et al. (editors). Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. (1987)

Freshney, R.I., Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition, Wiley-Liss Inc., ISBN 0-471-34889-9 (2000)

Frokjaer S. and Hovgaard L. (editors), Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Taylor & Francis (2000)

Gennaro, A.R. (editor), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition,., Mack Publishing Company (1990)

Horowitz, M.S., Adenoviruses, Chapter 68, in Virology, (B. N. Fields et al. (editors), 3rd Ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)

Kibbe A. (editor), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, Pharmaceutical Press (2000)

Kruse and Paterson (editors), Tissue Culture, Academic Press. (1973)

MacPherson M.J., Hams B.D., Taylor G.R. (editors), PCR2: A Practical Approach (1995)

Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)

Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., (1989)

Shenk, Thomas, Adenoviridae and their Replication, Chapter 67, in Virology, B. N. Fields et al. (editors)., 3rd Ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)

Watson et al., Recombinant DNA, 2nd ed., Scientific American Books. (1992)

#### Журналы.

Abbink, P., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Smits, S.,... Barouch, D. H. (2007). Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*, 81(9), 4654-4663. doi: 10.1128/JVI.02696-06

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Barry, P. A., Alcendor, D. J., Power, M. D., Kerr, H., & Luciw, P. A. (1996). Nucleotide sequence and molecular analysis of the rhesus cytomegalovirus immediate-early gene and the UL121-117 open reading frames. *Virology*, 215(1), 61-72. doi: 10.1006/viro.1996.0007

Belousova, N., Harris, R., Zinn, K., Rhodes-Selser, M. A., Kotov, A., Kotova, O.,... Alvarez, R. D. (2006). Circumventing recombination events encountered with production of a clinical-

grade adenoviral vector with a double-expression cassette. *Mol Pharmacol*, 70(5), 1488-1493.

Chan, Y. J., Chiou, C. J., Huang, Q., & Hayward, G. S. (1996). Synergistic interactions between overlapping binding sites for the serum response factor and ELK-1 proteins mediate both basal enhancement and phorbol ester responsiveness of primate cytomegalovirus major immediate-early promoters in monocyte and T-lymphocyte cell types. *J Virol*, 70(12), 8590-8605.

Chang, Y. N., Jeang, K. T., Chiou, C. J., Chan, Y. J., Pizzorno, M., & Hayward, G. S. (1993). Identification of a large bent DNA domain and binding sites for serum response factor adjacent to the NFI repeat cluster and enhancer region in the major IE94 promoter from simian cytomegalovirus. *J Virol*, 67(1), 516-529.

Foecking, M. K., & Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45(1), 101-105.

Gao, G. P., Engdahl, R. K., & Wilson, J. M. (2000). A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther*, 11(1), 213-219. doi: 10.1089/10430340050016283

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., 3rd, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 6(5), 343-345. doi: 10.1038/nmeth.1318

Gossen, M., & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., & Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268(5218), 1766-1769.

Hansen, S. G., Strelow, L. I., Franchi, D. C., Anders, D. G., & Wong, S. W. (2003). Complete sequence and genomic analysis of rhesus cytomegalovirus. *J Virol*, 77(12), 6620-6636.

Havenga, M., Vogels, R., Zuijdgeest, D., Radosevic, K.,

Mueller, S., Sieuwerts, M.,... Goudsmit, J. (2006). Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J Gen Virol*, 87(Pt 8), 2135-2143. doi: 10.1099/vir.0.81956-0

Heilbronn, R., & Weger, S. (2010). Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*(197), 143-170. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3\_5

Hoganson, D.K., Ma, J.C., Asato, L., Ong, M., Printz, M.A., Huyghe, B.G.,... D'Andrea, M.J. (2002). Development of a Stable Adenoviral Vector Formulation. *BioProcessing J.*, 1(1), 43-48.

Holterman, L., Vogels, R., van der Vlugt, R., Sieuwerts, M., Grimbergen, J., Kaspers, J.,... Havenga, M. (2004). Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol*, 78(23), 13207-13215. doi: 10.1128/JVI.78.23.13207-13215.2004

Lemckert, A. A., Grimbergen, J., Smits, S., Hartkoorn, E., Holterman, L., Berkhout, B.,... Havenga, M. J. (2006). Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity. *J Gen Virol*, 87(Pt 10), 2891-2899. doi: 10.1099/vir.0.82079-0

Maizel, J. V., Jr., White, D. O., & Scharff, M. D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, 36(1), 115-125.

Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S.,... Massie, B. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol*, 6, 43. doi: 10.1186/1472-6750-6-43

Ogun, S. A., Dumon-Seignover, L., Marchand, J. B., Holder, A. A., & Hill, F. (2008). The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect Immun*, 76(8), 3817-3823. doi: 10.1128/IAI.01369-

07

Powell, S. K., Rivera-Soto, R., & Gray, S. J. (2015). Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov Med*, 19(102), 49-57.

Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther*, 80(1), 35-47.

Rubnitz, J., & Subramani, S. (1984). The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 4(11), 2253-2258.

Schlabach, M. R., Hu, J. K., Li, M., & Elledge, S. J. (2010). Synthetic design of strong promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(6), 2538-2543. doi: 10.1073/pnas.0914803107

Smale, S. T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev*, 15(19), 2503-2508. doi: 10.1101/gad.937701

Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Bethune, M. P.,... Havenga, M. (2003). Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol*, 77(15), 8263-8271.

Walther, W., & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60(2), 249-271.

Zahn, R., Gillisen, G., Roos, A., Koning, M., van der Helm, E., Spek, D.,... Rodriguez, A. (2012). Ad35 and ad26 vaccine vectors induce potent and cross-reactive antibody and T-cell responses to multiple filovirus species. *PLoS One*, 7(12), e44115. doi: 10.1371/journal.pone.0044115

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая главный промотор гена немедленно-раннего ответа Aotine herpesvirus 1 (промотор AoHV-1), функционально связанный с гетерологичным трансгеном, где AoHV-1 промотор включает последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25.

3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, где промотор AoHV-1 функционально связан с регуляторной последовательностью, которая модулирует транскрипцию с промотора AoHV-1.

4. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, где промотор AoHV-1 функционально связан с регуляторной последовательностью, содержащей одну или несколько тетрациклин-индуцируемых операторных последовательностей (сайтов tetO).

5. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

6. Вектор по п.5, где вектор представляет собой плазмидный вектор.

7. Вирус, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

8. Вирус по п.7, где вирус представляет собой аденовирус.

9. Вирус по п.8, где аденовирус имеет по меньшей мере одну делецию в своем геноме, предпочти-

тельно по меньшей мере в участке E1 своего генома.

10. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, или вектор по любому из пп.5, 6, или вирус по любому из пп.7-9.

11. Клетка, содержащая в своем геноме молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1, где указанный промотор функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес белок, где AoHV-1 промотор включает последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25.

12. Клетка по п.10 или 11, где промотор AoHV-1 в геноме функционально связан с нуклеиновой кислотой, которая кодирует тетрациклин-индуцируемый белок-репрессор (TetR), где предпочтительно указанная клетка представляет собой клетку PER.C6.

13. Клетка, содержащая: (i) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1, функционально связанный с первым трансгеном, и (ii) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25, и где промотор hCMV содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 564-736 последовательности SEQ ID NO:4.

14. Клетка по п.13, где первый трансген кодирует TetR, где предпочтительно клетка представляет собой клетку PER.C6.

15. Клетка по п.14, где молекула нуклеиновой кислоты, содержащая промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном, представляет собой часть аденовируса.

16. Вектор, содержащий: (i) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую промотор AoHV-1, функционально связанный с первым трансгеном, и (ii) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую промотор hCMV, функционально связанный со вторым трансгеном, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25, и где промотор hCMV содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 578-736, где предпочтительно промотор hCMV содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 564-736 последовательности SEQ ID NO:4.

17. Способ получения представляющего интерес продукта экспрессии, включающий экспрессию в клетке-хозяине трансгена из молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, где трансген кодирует представляющий интерес продукт экспрессии.

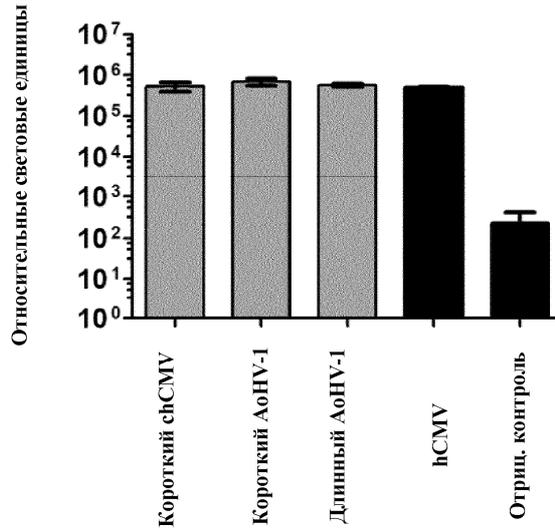
18. Способ по п.17, где продукт экспрессии представляет собой белок.

19. Способ по п.17 или 18, дополнительно включающий сбор представляющего интерес продукта экспрессии из клетки-хозяина или из культуральной среды, в которой культивируют клетку-хозяина, или как из клетки-хозяина, так и из культуральной среды.

20. Способ получения вируса, включающий размножение вируса в клетке, в которой экспрессируется гетерологичный ген, который участвует в размножении указанного вируса, при этом указанный гетерологичный ген находится под контролем промотора AoHV-1, и сбор вируса из указанной клетки или из культуральной среды, в которой культивируют указанную клетку, или как из клетки, так и из культуральной среды, где промотор AoHV-1 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична нуклеотидам 131-286 последовательности SEQ ID NO:25.

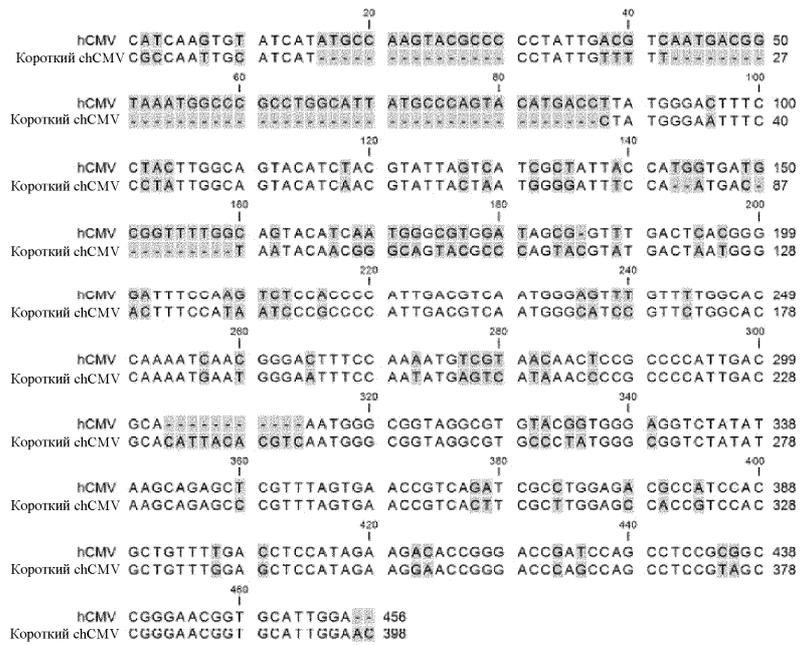
21. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по п.5 или 6 или вирус по любому из пп.7-9 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

22. Способ получения аденовируса, включающий размножение аденовируса, который кодирует трансген, находящийся под контролем промотора hCMV, который функционально связан с одним или несколькими сайтами tetO, в клетке по п.12 и предпочтительно выделение аденовируса.



Фиг. 1

**A.**



Фиг. 2

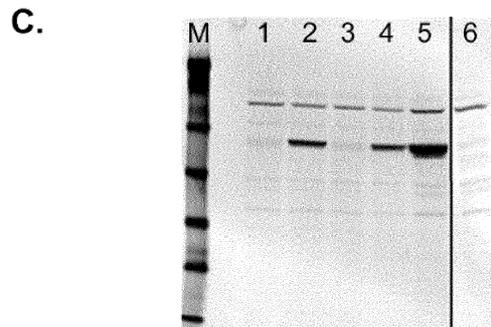
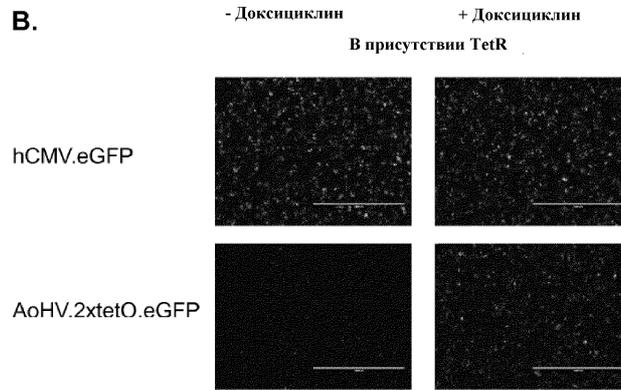
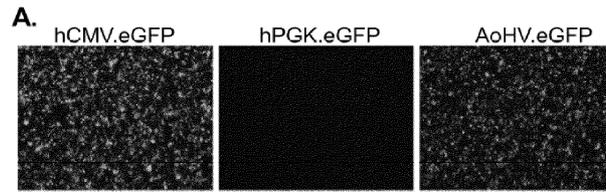
**B.**

			20			40	
hCMV	AAATCAATAT	TGGCTATTGG	CCATTGCATA	CGTTGTATCC	ATATCATAAT	50	
Короткий AoHV-1	AAATCAATGA	CGCTTTTGG	CAA		GC	20	
	00		80		100		
hCMV	ATGTACATTT	ATATTGGCTC	ATGTCCAAACA	TTACCGCCAT	GTTGACATTC	100	
Короткий AoHV-1	ATATACATCC	GTCTTGGC				38	
		120		140			
hCMV	ATTATTGACT	AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	150	
Короткий AoHV-1	ATTATTGACC	AGCTTTTAAT	AGGGGTTAAA	TGGGG		61	
	180		180		200		
hCMV	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	200	
Короткий AoHV-1			AC	TTCCATAAG	CCCACCCCT	83	
		220		240			
hCMV	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CCGCCCATTTG	ACGTCAATAA	TGACGTTATGT	250	
Короткий AoHV-1	CATTTGGCAC	CAAAAAG	GGGGATT	CTATTATTAG	TCAATATGT	125	
	280		280		300		
hCMV	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	TGGGTGGAGT	300	
Короткий AoHV-1	CCTTG	GGCCAATAG	CCA	GTGACGTCAA	TGGGAACGG	160	
		320		340			
hCMV	ATTTACGGTA	AACTGCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	350	
Короткий AoHV-1	GGCC	AGTTCCCTT	T			175	
	380		380		400		
hCMV	AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATT	400	
Короткий AoHV-1	CCCA	CCATTACCG	CAATGGTGG			198	
		420		440			
hCMV	TGCCCAGTAC	ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGGAG	TACATGTACG	450	
Короткий AoHV-1				GTGG	GGAAATCCA	212	
	480		480		500		
hCMV	TATTAGTCAT	GGCTATTACC	ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	500	
Короткий AoHV-1	TATTAGTCAA	TGTTCTTG			GCACCAA	237	
		520		540			
hCMV	GGCGTGGAT	AGCGTTTGA	CTCACGGGGA	TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	550	
Короткий AoHV-1		A	ACCGCGGGA	CTTTC	CCAT	256	
	580		580		600		
hCMV	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	GACTTCCAA	600	
Короткий AoHV-1	TGACGTCAAT	GGAAAGGGGC	GTACCGGGA	GTGACCATGG	GGTTCCCGG	306	
		620		640			
hCMV	AATGTCGTAA	GAACCTCCGC	CCATTGACCG	AAATGGGCGG	TAGGGGTGT	649	
Короткий AoHV-1		CGGAG	TTATGGGCGT	TACTGGGCGG	TTCTGGGGG	342	
	680		680		700		
hCMV	ACGGTGGGA	GGTC	TATATAAGCA	GAGCTCGTTT	AGTGAACCGT	692	
Короткий AoHV-1	GACCATGGGC	TGTCCTAGGG	TATATAAGCA	GAGCCCGGTT	AGCAGACCGC	392	
		720		740			
hCMV	CAGATCGCCT	GGAGACGCCA	TCCACGCTGT	TTTGACCTCC	ATAGAAGACA	742	
Короткий AoHV-1	CATTCCGCTT	CAAGACAGCG	TGAGGGAC	CAGGTTCTCC	GGACCAGCCA	441	
	780		780				
hCMV	CCGGGACCGA	TCCAGCCTCC	GCCGCGGGGA	ACGGTGCATT	GG	785	
Короткий AoHV-1	CCGGGACCGA	GCGGCTAGC	CTAGCCGGGG	ACCCTTCACT	GG	483	

Фиг. 2 (продолжение)

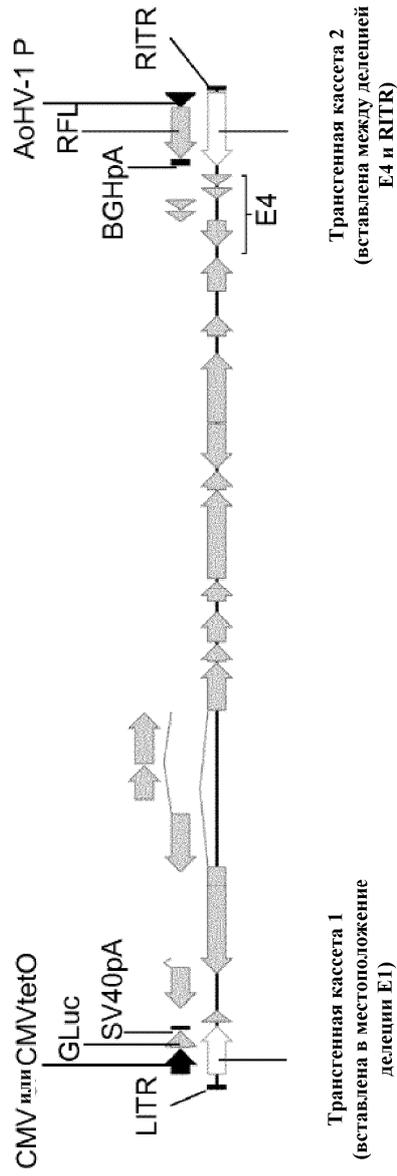


Фиг. 3

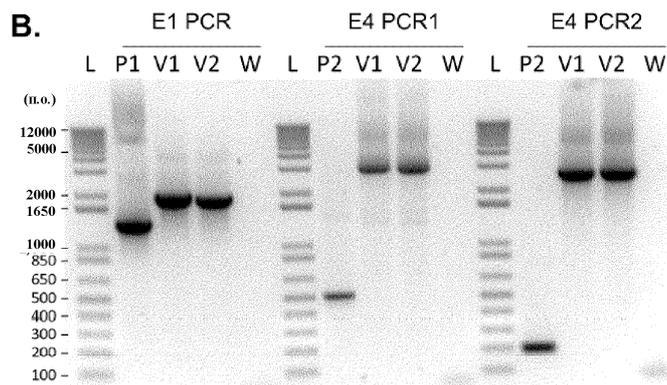


Фиг. 4

A.



Фиг. 5



	E1 PCR	E4 PCR1	E4 PCR2
P1	1353 п.о.	Н.д.	Н.д.
P2	Н.д.	508 п.о.	205 п.о.
V1	1959 п.о.	2912 п.о.	2609 п.о.
V2	1905 п.о.	2912 п.о.	2609 п.о.

Фиг. 5 (продолжение)

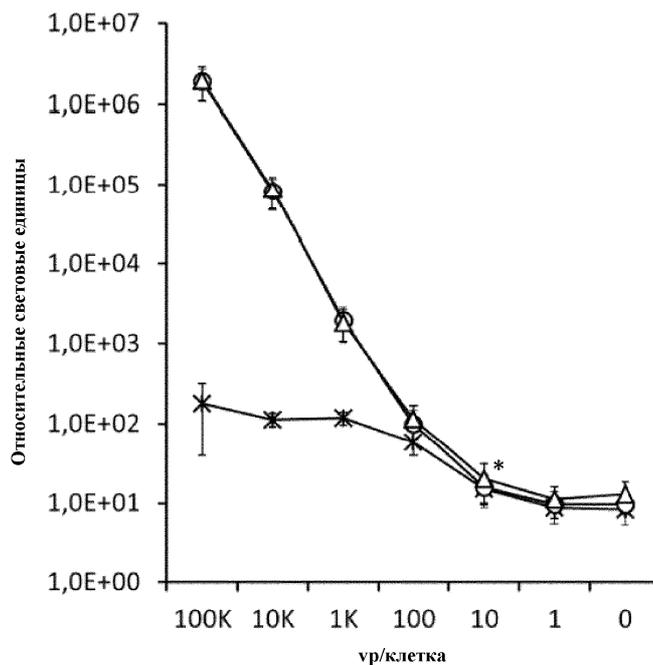
**C.**

**GLuc-активность**

✱-Ad26.CMV (пустой)

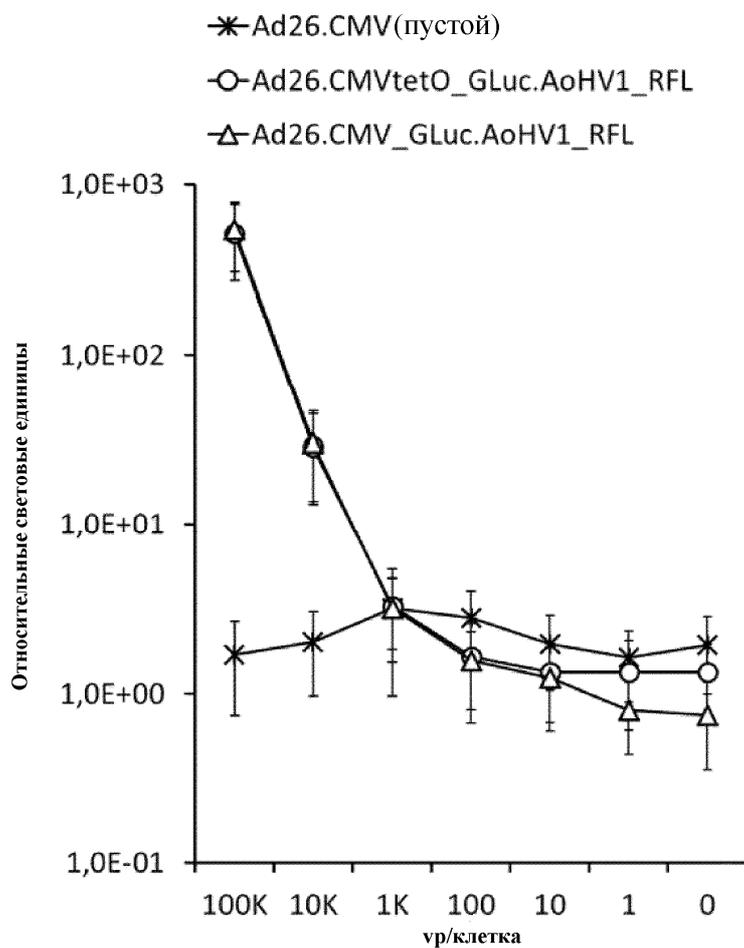
○-Ad26.CMVtetO\_Gluc.AoHV1\_RFL

△-Ad26.CMV\_Gluc.AoHV1\_RFL



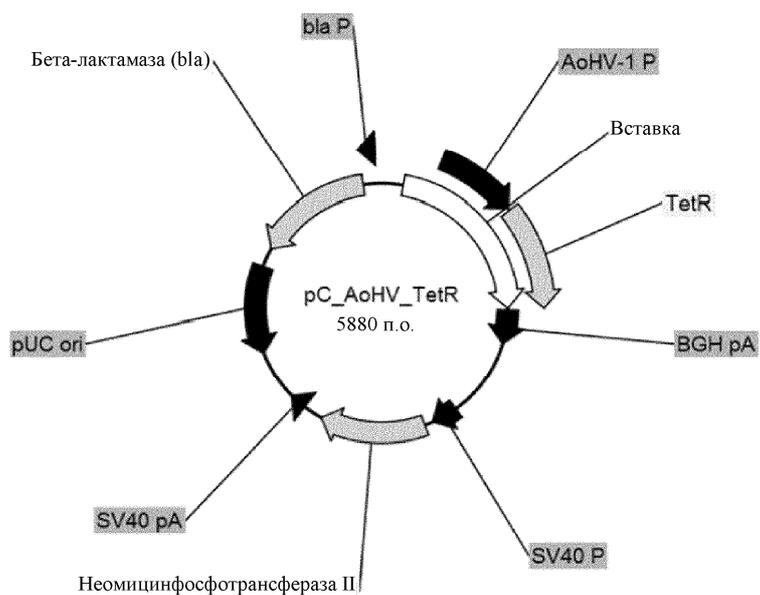
Фиг. 5 (продолжение)

### D. RFL-активность



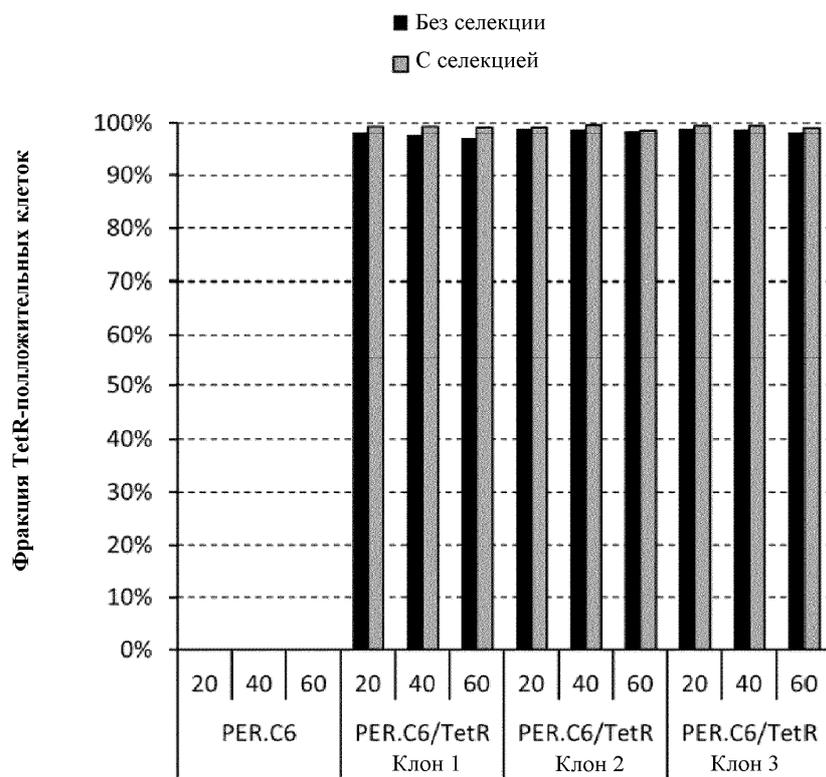
Фиг. 5 (продолжение)

### A.

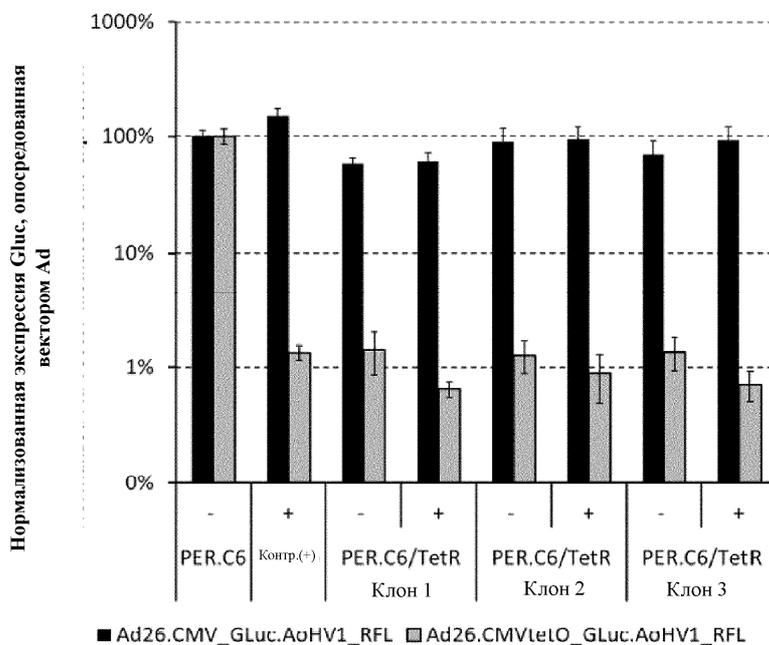


Фиг. 6

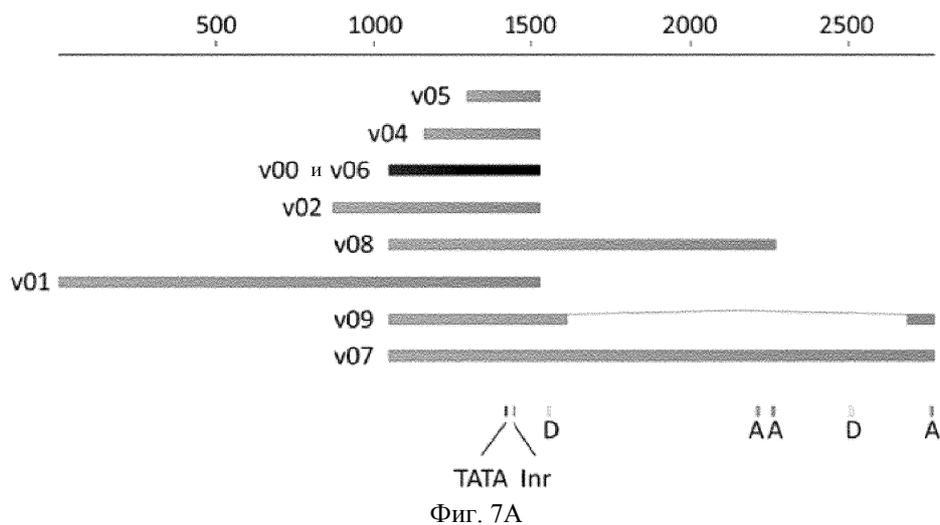
B.



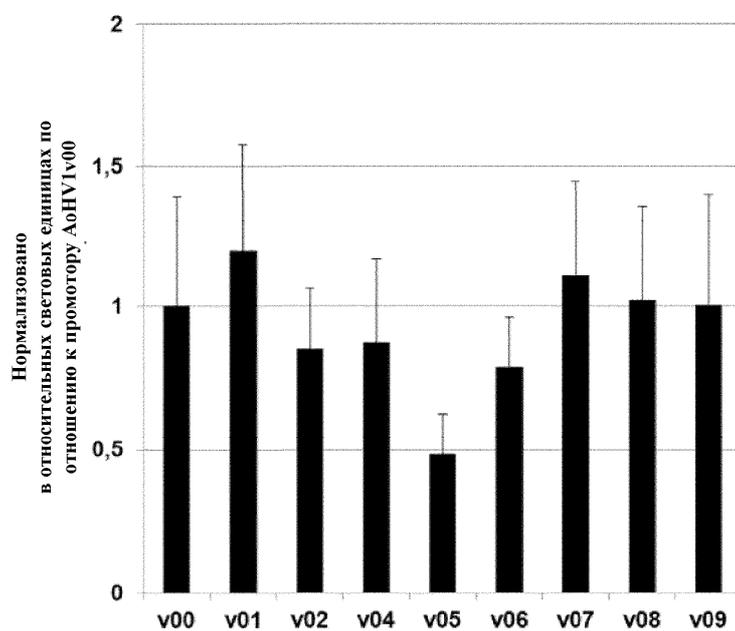
C.



Фиг. 6 (продолжение)



Фиг. 7А



Фиг. 7В